

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ANÁLISES BROMATOLÓGICA E FITOQUÍMICA DE *Himatanthus drasticus*
(Mart.) Plumel, 1991 (APOCYNACEA) E AVALIAÇÃO DA AÇÃO
TOXICOLÓGICA EM CAMUNDONGOS**

HILDECY SILVA DA LUZ

São Luís-MA
2011

HILDECY SILVA DA LUZ

**ANÁLISES BROMATOLÓGICA E FITOQUÍMICA DE *Himatanthus drasticus*
(Mart.) Plumel, 1991 (APOCYNACEA) E AVALIAÇÃO DA AÇÃO
TOXICOLÓGICA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós - graduação em Ciência Animal como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Clara Gomes dos Santos.

São Luís-MA
2011

HILDECY SILVA DA LUZ

**ANÁLISES BROMATOLÓGICA E FITOQUÍMICA DE *Himatanthus drasticus*
(Mart.) Plumel, 1991 (APOCYNACEA) E AVALIAÇÃO DA AÇÃO
TOXICOLÓGICA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós - graduação em Ciência Animal como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Dissertação de Mestrado aprovada em 31 de outubro de 2011 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Sônia de Maria Farias Freire – (Biotecnologia)
(Universidade Federal do Maranhão)

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo – (Anatomia Patológica)
(Universidade Estadual do Maranhão)

Prof.^a Dr.^a Ana Clara Gomes dos Santos – (Medicina Veterinária -
Parasitologia Veterinária)
(Universidade Federal de Campina Grande)

Da Luz, Hildecy Silva

Análises bromatológica e fitoquímica de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, 1991 (Apocynacea) e avaliação da ação toxicológica em camundongos /Hildecy Silva da Luz. – São Luís, 2011.

115 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual do Maranhão, 2011

Orientadora: Profa. Dra. Ana Clara Gomes dos Santos

1. Bromatologia. 2. Fitoquímica. 3. Toxicologia. 4. Histopatologia. 5. *Himatanthus drasticus* .I. Título.

CDU 615.9[633.913.1:599.3234]

À DEUS, minha fortaleza, sem
ele minha vida não teria nenhum
sentido!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus que permitiu que tudo isso fosse verdade. Obrigada meu Senhor, maravilhoso e misericordioso.

À Profa. Dra. Ana Clara Gomes dos Santos pela profissional muito competente e grande pessoa maravilhosa que é. Obrigada pela orientação, apoio, incentivo e amizade.

À Universidade Estadual do Maranhão em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal.

À Universidade Federal do Maranhão (UFMA) por ter me liberado para cursar a pós – graduação.

Ao Prof. Dr. Roberto Sigfrido Gallegos Olea (UFMA) que permitiu que todo o trabalho de fitoquímica fosse realizado no Laboratório de Produtos Naturais (LPN).

Ao Prof. Dr. Ferdinan Almeida Mello (UEMA), pela sua grande disponibilidade em contribuir com o seu conhecimento de patologia para a realização da minha dissertação.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges (UFMA), por suas orientações sobre a fitoquímica.

Ao Prof. Dr. Francisco Carneiro Lima (UEMA), por suas orientações sobre a bromatologia.

À minha grande amiga Kedma (UFMA), por ter realizado os testes de fitoquímica.

Ao Francisco e Andréia Borges (UNESP) por terem participado no trabalho experimental.

A todos os meus colegas do Biotério Central (UFMA), Bruno, Karla, especialmente meu grande amigo David por todo seu apoio.

A todos os colegas de pós-graduação (UEMA), especialmente Poliana, Diego e Lucélia que me ajudaram nos momentos difíceis.

À Diana Ferreira Lima, pois enquanto eu me dedicava aos estudos, ela cuidava das minhas filhas. Muito obrigada.

A todos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui deixo o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Justificativa	18
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Geral	18
1.2.2 Específicos	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Uso de plantas medicinais	20
2.2 Botânica, aspectos biológicos, bromatologia e fitoquímica da espécie <i>Himatanthus drasticus</i>	25
2.2.1 Família Apocynaceae	25
2.2.2 Gênero <i>Himatanthus</i> : aspectos biológicos e farmacológicos	26
2.2.3 Espécie <i>Himatanthus drasticus</i>	28
2.2.4 Caracterização bromatológica	31
2.3 Composição química de vegetais	33
2.3.1 Terpenos	33
2.3.2 Compostos Fenólicos	34
2.3.3 Alcalóides	35
2.3.4 Cumarinas	37
2.3.5 Saponinas	38
2.3.6 Taninos	38
2.3.7 Cromatografia	38
2.4 Efeitos mutagênicos com uso de drogas químicas e plantas medicinais	40
2.5 Testes citogenéticos para a determinação da genotoxicidade	45
CAPÍTULO 2	46
CARACTERIZAÇÃO BROMATOLÓGICA E ANÁLISE FITOQUÍMICA DO VEGETAL <i>Himatanthus drasticus</i> PLUMEL (APOCYNACEAE) DA MESORREGIÃO LESTE MARANHENSE	46
RESUMO	46
ABSTRACT	47
1 INTRODUÇÃO	48
1.1 Justificativa	50
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 Coleta do vegetal e local de processamento	51
2.2 Botânica e Bromatologia	51
2.3 Análise Fitoquímica	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1 Botânica e Bromatologia	54
4 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65

CAPÍTULO 3		
	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCÓOLICO DE <i>Himatanthus drasticus</i> (MART.) PLUMEL (APOCYNACEAE) EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA EM CAMUNDONGOS SWISS	71
	RESUMO	71
	ABSTRACT	72
1	INTRODUÇÃO	73
1.1	Justificativa	75
2	MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1	Teste de Metáfase	76
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.1	Fitoquímica	79
3.2	Teste de Metáfase	79
4	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88
CAPÍTULO 4		91
1	CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXOS	109

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	CAPÍTULO I	
Quadro 1	- Atividades farmacológicas e indicações populares de espécies do gênero <i>Himatanthus</i> registradas na literatura	30
	CAPÍTULO II	
Tabela 1	- Fracionamento em Coluna Cromatográfica do Subextrato Acetato de Etila de <i>Himatanthus drasticus</i> proveniente do município de Caxias, MA.....	53
Tabela 2	- Teores médios (%) de Cinzas, MS, MM, FB, PB, P, EE, ENN, DN, FDA, Lignina e EB (kcal/kgMS) de <i>Himatanthus drasticus</i> proveniente do município de Caxias, MA.....	55
Tabela 3	- Peso Seco e Rendimento médio do Extrato Bruto Hidroalcoólico e subextratos de <i>Himatanthus drasticus</i>	56
Tabela 4	- Prospecção química do EBHA de <i>Himatanthus drasticus</i> e dos Subextratos	59
Tabela 5	- Reunião das Frações do Subextrato Acetato de Etila.....	63
	CAPÍTULO 3	
Tabela 1	- Anomalias Estruturais e Índice Mitótico (%) das aberrações cromossômicas da medula óssea em camundongos machos (<i>Mus musculus</i>) tratados com EBHA de <i>Himatanthus drasticus</i> , nas concentrações de 100; 75; 50; 25; 10% e controle negativo	82
Tabela 2	- Avaliação média das aberrações cromossômicas da medula óssea em camundongos machos (<i>Mus musculus</i>) tratados com EBHA de <i>Himatanthus drasticus</i> , nas concentrações de 100; 75; 50; 25; 10% e controle negativo	84

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2	
Figura 1	- Cromatogramas do EBHA e Subextratos. Fase móvel: CHCl ₃ :MeOH (8,5:1,5 v:v). Revelação com vapores de iodo 57
Figura 2	- Cromatogramas do EBHA e Subextratos. Fase móvel: CHCl ₃ : MeOH (8,0:2,0 v:v). Revelação com vapores de iodo 57
Figura 3	- Cromatogramas das frações 1-19 obtidas pelo fracionamento da Subextrato Acetato. Fase móvel: CHCl ₃ : MeOH (75:25 v:v). Revelação com vapores de iodo 63
Figura 4	- Cromatogramas das frações reunidas pelo fracionamento do Subextrato Acetato. Fase móvel: CHCl ₃ :MeOH (8,5:1,5 v:v). Revelação com vapores de iodo..... 63
CAPÍTULO 3	
Figura 1	- Demonstrativo das Aberrações Cromossômicas: GAP, CP, Qcmt, MD, FAP e FAS encontradas em células de medula óssea em camundongos machos (<i>Mus musculus</i>), de acordo com as concentrações de 100; 75; 50; 25 e 10% e o controle negativo pela ação do EBHA de <i>Himatanthus drasticus</i> 83

LISTA DE SIGLAS

a.C	- Antes de Cristo
ABA	- Ácido Abscísico
AC	- Aberrações Cromossômicas
ADN	- Ácido Desoxirribonucleico
AE	- Anomalias Estruturais
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	- Official Methods of Analysis
AT	- Anomalias Totais
BR	- Brassinoesteróides
CaCl ₂	- Cloreto de Cálcio
CC	- Cromatografia em Coluna
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CEBEA	- Comissão de Ética e Bem Estar Animal
CH ₃ CO	- Anidro Acético
CH ₃ COOCH ₂ CH ₃	- Acetato de Etila
CH ₃ COOH	- Ácido Acético
CHCl ₃	- Clorofórmio
CHO	- Células de ovários de hamster chinês
CKs	- Citocininas
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação
CP	- Cromossomos Pulverizados
CP	- Cromatografia em Papel
CPA	- Colchicina
DMT N	- N-dimetiltriptamina
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
EB	- Energia Bruta
EBHA	- Extrato Bruto Hidroalcoólico
EE	- Extrato Etéreo
EN	- Extrato Nitrogenado
ENN	- Extrativo não nitrogenado
ETOH	- Etanol
FAP	- Fragmentos Dicêntricos
FAS	- Fragmentos Acêntricos Simples
FB	- Fibra Bruta
FDA	- Fibra em Detergente Ácido
FDN	- Fibra em Detergente Neutro
FECL ₃	- Cloreto Férrico
GAPs	- Cromossomos com Falhas Pequenas
GAs	- Giberelinas
H ₂ O	- Água
H ₂ SO ₄	- Ácido Sulfúrico
HCL	- Ácido Clorídrico
HE	- Hematoxilina-Eosina

i.p.	- Intra Peritoneal
IM	- Índice Micrométrico
KCL	- Cloreto de Potássio
KOH	- Hidróxido de Potássio
L	- Lignina
MA	- Maranhão
MD	- Cromossomos muito Danificados
MeOH	- Metanol
N	- Nitrogênio
Na ₂ SO ₄	- Sulfato de Sódio
NACL	- Cloreto de Sódio
NAH ₂ PO ₄	- Fosfato Monobásico de Sódio
NAOH	- Hidróxido de Sódio
NO	- Óxido Nítrico
OH	- Hidroxila
OMS	- Organização Mundial de Saúde
P	- Fósforo
p.v.	- Peso Vivo
PB	- Proteína Bruta
PBS	- Tampão Fosfato Salino
PCEs	- Eritrócitos Policromáticos
ppm	- Parte Por Milhão
Qcmt	- Quebra de Cromatina
ROS	- Células Reativas de Oxigênio
S. Ac	- Subextrato Acetato de Etila
S. Aq	- Subextrato Aquoso
S. Bu	- Subextrato n-Butanol
S. He	- Subextrato Hexânico
SP	- São Paulo
UEMA	- Universidade Estadual do Maranhão
UFMA	- Universidade Federal do Maranhão
UNESP	- Universidade Estadual Paulista
UV	- Ultravioleta

ANÁLISES BROMATOLÓGICA E FITOQUÍMICA DE *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, 1991 (APOCYNACEA) E AVALIAÇÃO DA AÇÃO TOXICOLÓGICA EM CAMUNDONGOS

Hildecy Silva da Luz¹; Ana Clara Gomes dos Santos²

RESUMO

O uso indiscriminado do vegetal *Himatanthus drasticus* (Janaúba) por criadores de pequenos ruminantes foi o que objetivou a realização do estudo bromatológico, fitoquímica do vegetal e a ação toxicológica. Cascas, sementes e folhas da janaúba foram coletadas na mesorregião Leste do Maranhão conduzidas aos laboratórios para a identificação botânica, bromatologia, fitoquímica, teste de metáfase em células da medula óssea de camundongos e análise histopatológica dos órgãos vitais. A fitoquímica foi pela metodologia da Prospecção Preliminar e CCD, realizando testes para as diversas classes de metabólitos secundários. A partir do extrato bruto hidroalcolico (EBHA) de *H. drasticus* em diversas concentrações (100; 75; 50; 25; 10%) a partir de 231,87g para realização do Teste de Metáfase em células da medula óssea de camundongos e análise histopatológica dos órgãos vitais coletados durante a necrópsia após 24h da administração do extrato. O vegetal encontra-se depositado em exsicata sob o registro nº 01032 no Herbário Ático Seabra (UFMA). Os resultados da bromatologia foram: matéria seca - (MS) (92,01%), matéria mineral - (MM) (3,75%), proteína bruta - PB (4,02%), extrato etéreo - EE (3,08%) e fibra em detergente neutro - FDN (51,35%). Os testes fitoquímico foram considerados positivos por reações de precipitações, coloração, formação de espuma e por formação de manchas coloridas na placa cromatográfica. O EBHA-Janaúba apresentou discreta ação em células de medulas do tipo GAP, CP, QcmT, MD, FAP, FAS na concentração de 100 e 75%. Não foi evidenciada nenhuma alteração histológica de células teciduais de órgãos de eleição, considerando-se assim inócua ao uso do EBHA-Janaúba nas dosagens abaixo de 75%. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o vegetal apresenta teor de gordura baixo e não deve ser utilizado como forrageira, mas a presença de carboidratos fibrosos no vegetal poderá ser usado como volumoso na alimentação animal. As classes de metabólitos secundários que apresentaram maior expressividade são os alcalóides e taninos, quando analisadas por Prospecção e flavonóides e terpenos quando analisadas por CCD, com isso o *H. drasticus* apresenta elementos indicativos de ação farmacológica e não apresenta toxicidade.

Palavras-chaves: Bromatologia, Fitoquímica, Teste toxicológico, Histopatologia, *Himatanthus drasticus*, Maranhão.

¹ Mestranda Curso de Ciência Animal/UEMA.

² Bolsista Fixação de Doutor/Ciência Animal/UEMA.
Revista Brasileira de Farmacologia.

BROMATOLOGICAL AND PHITOCHEMICAL ANALYSIS OF *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, 1991 (APOCYNACEA) AND TOXICOLOGICAL ACTION AVALIATION IN MICE

ABSTRACT

The indiscriminate use of plant *Himatanthus drasticus* (Janaúba) by plant breeders of small ruminants motivated this bromatological and phitochemical study of the vegetal and its toxicological action. Shells, seeds and leaves of Janaúba were collected in the east middle region of Maranhão (Brazil) and handed to the laboratories for their botanical, bromatological and phitochemical identification, also hispatological analysis of nutaphase in bone marrow cells of mice and hispatological analysis of the vital organs. It was used the phitocheminal approach of the methology of the preliminar prospection and CDD, with tests for the several classes of secondary metabolites. From the brute extract hydroalcoholic (EBHA) of *H. drasticus* in several concentrations (100; 75; 50; 25; 10%) and also from 231,87g to the realization of metaphase in cells of the marrow bone of mice and hispatological analysis of vital organs collected during the necropsy after 24h of administration of the extract. The vegetal is disposed in exsicata and the registration nº 01032 in the Seabra Ático Herbarium (UFMA). The results from the bromatology were: dry material – (MS) (92,01%), mineral material – (MM) 3,75%), brute protein - PB (4,02%), ethereal extract - EE (3,08%) and fiber in neutral detergent - FDN (51,35%). The phitochemical tests were considered positive by reactions of precipitations, coloration, forming of foaming and colored spots in the cromatographical plate. The EBHA – Janaúba presented a slight action in cells of the type marrow GAP, CP, QcmT, MD, FAP, FAS in the concentration of 100 and 75%. It wasn't observed any change histological of tissue cells of organs of choice, being considered thus harmless to the use of the EBHA-Janaúba in the obtained results it is concluded that the plant presents low fat and shouldn't be used like fodder, but the presence of fibrous carbohydrate in the plant may be used like bulk element in the animal food. The classe of secondary metyabolites which presented a major expressive use are the alkaloids and tannins when analysed by prospection and flavonoids and terpenes when analysed by CCD. There fore the *H. drasticus* presents indicative elements of pharmacoligal action and doesn't express toxicity.

Key words: Food Science, Phytochemistry, toxicology testing, histopathology, *Himatanthus drasticus*, Maranhão.

CAPÍTULO 1

ANÁLISES BROMATOLÓGICA E FITOQUÍMICA DE *Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL, 1991 (APOCYNACEA) E AVALIAÇÃO DA AÇÃO TOXICOLÓGICA EM CAMUNDONGOS

1 INTRODUÇÃO

Existem no mundo cerca de 250 mil espécies botânicas conhecidas, das quais apenas cerca de 5% foram estudadas quimicamente, e uma porcentagem ainda menor é estudada sob o ponto de vista farmacológico. As plantas têm sido muito importantes nos últimos anos para a obtenção de diversos fármacos (CECHINEL FILHO; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os vegetais são as maiores e melhores fontes de fármacos para a humanidade (BEZERRA et al., 2008).

As diretrizes da OMS, (2003) apontam para a necessidade de se identificar práticas seguras na medicina tradicional, fomentando uma base sólida para que se garanta, através dela, um direito universal e constitucional de todo cidadão, que é a saúde. A pesquisa como forma de fundamentar a medicina popular é essencial para as camadas mais pobres da população, como uma maneira de ajudar a melhorar o seu *status* sanitário, ampliando o acesso aos tratamentos com um custo reduzido. Assim, torna-se necessário identificar práticas seguras e eficazes através das quais esses tratamentos alternativos se tornem viáveis (OMS, 2008 *apud* MACHADO, 2008).

Sabe-se que a maioria dos fármacos de origem vegetal utilizados atualmente foi pesquisada e posteriormente levada ao mercado, baseados em informações da chamada medicina tradicional ou popular, demonstrando assim que as substâncias de origem vegetal têm papel essencial na obtenção de medicamentos e que partindo do conhecimento popular, bons resultados podem ser obtidos (COLOMBO, 2008). Nesse sentido, a botânica vem contribuindo para o desenvolvimento de novas drogas, como ciência que se

ocupa do estudo do conhecimento e das conceituações, porque envolve não só a botânica como também a fitoquímica, a farmacologia, a medicina, a antropologia e outras áreas de conhecimento (AMOROZO, 1996; ELISABETSKY, 2003; ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

A bromatologia consiste no estudo dos alimentos, nas características de sua composição química e nas modificações de seus componentes durante o processamento (MARTINS, 2007).

A família Apocynaceae compreende aproximadamente 250 gêneros presentes em duas subfamílias, Apocynoideae e Plumerioideae e 2000 espécies, distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta. São plantas de hábito variado, ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras. E, têm como característica marcante a presença de látex em laticíferos não-articulados, ramificados ou não-ramificados, nos órgãos vegetativos, reprodutivos, flores com prefloração contorta e vivem tanto nos campos como nas matas. Conhecida como Janaguba, sendo muito comum em alguns estados do Nordeste do Brasil e Amazônia. Na região do Cariri no Nordeste, o uso medicinal popular local do látex, assim como da casca, é muito eficaz no tratamento de tumores, verminoses, gastrites, artrites e também contra o câncer (PLUMEL, 1991; MODESTO, 1997; CRONQUIST, 1988; JOLY, 2002; LORENZI; MATOS, 2008).

A preservação do meio ambiente e a prevenção dos efeitos danosos causados pelo seu uso não apropriado são preocupações cada vez maiores no mundo atual (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

As plantas contêm inúmeros constituintes, e seus extratos, quando avaliados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. As principais classes de constituintes químicos de plantas que podem ser detectadas com a aplicação de testes analíticos padrões são: ácidos graxos, terpenóides, esteróides, compostos fenólicos, alcalóides, cumarinas e flavonóides (WATTENBERG, 1985; MATOS, 1998).

Estudos indicam que metabólitos secundários de plantas de forma isolada, principalmente saponinas e compostos fenólicos, podem causar mudanças na membrana celular eritrocítica e conseqüentemente produzir hemólise (ZHANG et al., 1997). A estabilidade mecânica da membrana eritrocítica é um bom indicador de danos *in vitro* em triagens de citotoxicidade, já que drogas podem alterar esta delicada estrutura e o citoesqueleto, por alterações do coeficiente de partição na membrana destas células (SHARMA, 2001). Eritrócitos também fornecem um modelo preliminar para o estudo de efeitos protetores e tóxicos de substâncias ou situações associadas com o estresse oxidativo, sendo um possível indicador desse tipo de dano às células (LEXIS; FASSET; COOMBES, 2006).

Mutação é uma alteração súbita e herdável na estrutura do material genético e como tal, é uma fonte extremamente importante de variabilidade genética nas populações de seres vivos (BURNS; BOTTINO, 1991). Entretanto, em curto prazo e do ponto de vista de um único organismo, a alteração genética é quase sempre prejudicial, especialmente em organismos, nos quais a alteração genética está mais inclinada a perturbar o desenvolvimento e a fisiologia extremamente complexos e sintonizados, de um organismo (ALBERTS, 2002).

A ocorrência de mutações espontâneas na natureza é relativamente de baixa freqüência e de difícil identificação, por essas serem na sua maioria deletérias (ALLARD, 1960). Para Nóbrega (1998), alterações na seqüência de bases do ácido desoxirribonucléico (DNA), molécula que contém o código genético dos seres vivos, ocorrem espontaneamente na natureza e podem ser intensificadas por agentes mutagênicos químicos ou físicos como a radiação ionizante. Para Carneiro et al. (1987), o efeito dos mutagênicos, apesar de ser ao acaso, pode induzir modificações em caracteres desejáveis.

A utilização cada vez mais acentuada de produtos como fármacos, agroquímicos, cosméticos, corantes e muitos outros, tem demonstrado aumento nas taxas de mutagênese ambiental (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Tais agentes mutagênicos invadem a célula e se dirigem ao núcleo causando alterações no material genético podendo desregular o ciclo

celular, fazendo com que a célula se reproduza descontroladamente invadindo tecidos adjacentes, dando início à formação de tumores.

1.1 Justificativa

Algumas espécies do gênero *Himatanthus* vêm sendo estudadas com relação a sua constituição química. Esses estudos mostram a presença de compostos químicos biologicamente ativos variados, tais como terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos e taninos. No entanto, na espécie *H. drasticus* não existem estudos sobre a bioatividade medicinal ou na farmácia tradicional popular. Muito pouco se conhece a respeito do potencial farmacológico desse vegetal.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Caracterizar a composição bromatológica do vegetal *Himatanthus drasticus*, a fitoquímica do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHA-Janaúba); avaliar os efeitos da mutagênese através de teste de metáfase em células da medula óssea e estudos histopatológicos em órgão vitais de camundongos (*Mus musculus*).

1.2.2 Específicos

- Verificar a composição bromatológica da casca da *H. drasticus*;
- Realizar triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabólitos secundários do EBHA de cascas de *H. drasticus*;
- Evidenciar o perfil cromatográfico do EBHA de cascas de *H. drasticus*;

- Avaliar a toxicologia do EBHA *H. drasticus* através do teste de metáfase em células de medula óssea de camundongos.

- Avaliar a ação toxicológica do EBHA de *H. drasticus*, através do estudo histopatológico em pulmão, coração, fígado, baço e rim.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Uso de plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais como alternativa terapêutica vem atingindo um público cada vez maior e este crescimento requer dos pesquisadores um maior empenho, no sentido de fornecer informações relativas à correta identificação, do sistema produtivo destas plantas e preparo adequado de medicamentos. Lorenzi; Matos (2008) relataram que o emprego correto de plantas para fins terapêuticos pela população em geral, requer uso de plantas medicinais selecionadas por sua eficácia e segurança terapêutica, baseadas na tradição popular ou cientificamente validadas como medicinais.

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial utilizadas pelo homem moderno (LORENZI; MATOS, 2008).

Miguel e Miguel (2004) relatam que as plantas tem sido desde a antigüidade, um recurso ao alcance do ser humano. Durante milênios o homem empiricamente aprofundou seus conhecimentos a fim de buscar a melhoria nas condições de alimentação e cura de suas enfermidades, demonstrando uma estreita inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução. Aplica-se o termo conhecimento tradicional para referir-se ao conhecimento que o povo local, isto é, residentes da região sob estudo, conhece sobre o ambiente natural (MARTIN, 1995). Sabe-se que o uso das espécies vegetais com fins de tratamento, cura de doenças e sintomas se perpetuaram na história da civilização humana e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como eficaz fonte terapêutica (QUEIROZ, 1986).

Um exemplo da ligação do homem com as plantas é a utilização destas com fins medicinais, como os índios que preparavam seus

medicamentos com plantas retiradas das florestas, da mesma forma, com os benzedores, curandeiros e xamãs, com o conhecimento herdado dos magos e feiticeiros do passado (RIZZINI et al.,1995). Cunha, (1989) relatou que este conhecimento vem sendo modificado ao longo do tempo, devido ao acelerado mecanismo de modernização que provoca visões diferentes dos homens sobre o meio ambiente. Assim, novas formas de relacionamento e interação com o meio, provocam em última instância alterações na utilização dos vegetais para atender às novas necessidades de sua sobrevivência. Todo esse conhecimento foi passado oralmente ao longo de gerações, que juntamente com mitos e rituais formavam parte importante das culturas locais (LORENZI; MATOS, 2008).

Entende-se como planta medicinal aquela que, nativa ou cultivada, é utilizada com fins medicinais (OMS, 2003b). Estas devem sua ação farmacológica a princípios ativos conhecidos, fornecendo eventualmente matéria-prima para a indústria farmacêutica (RIZZINI; MORS, 1995).

Fitoterápico é todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas dos vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (ANVISA, 2004).

A fitoterapia (do grego *therapeia* = tratamento e *phyton* = vegetal) pode ser definida como o estudo e a aplicação dos efeitos terapêuticos de drogas vegetais e seus derivados. Ela surgiu independente na maioria dos povos. Na China, surgiu por volta de 3000 a.C. quando o imperador Cho-Chin-Kei descreveu as propriedades do Ginseng e da Cânfora (ELDIN; DUNFORD, 2001).

Há uma grande quantidade de plantas medicinais, em todas as partes do mundo, utilizadas há milhares de anos para o tratamento de doenças, através de mecanismos na maioria das vezes desconhecidos. O estudo desses mecanismos e o isolamento do princípio ativo da planta é uma das principais prioridades da farmacologia. Enquanto, o princípio ativo não é isolado, as plantas medicinais são utilizadas de forma caseira, principalmente através de chás, ultradiluições, ou de forma industrializada, com extrato homogêneo da

planta (MILLONIG; STADLMANN; VOGEL, 2005; CHAN et al., 2005; BERRIN et al., 2006).

O uso de plantas medicinais não é isento de risco. Além do princípio ativo terapêutico, a mesma planta pode conter outras substâncias tóxicas, a grande quantidade de substâncias diferentes pode induzir a reação alérgica, pode haver contaminação por agrotóxicos ou por metais pesados e interação com outras medicações, levando a danos à saúde e até predisposição para o câncer. À medida que os princípios ativos são descobertos, eles são isolados e refinados de modo a eliminar agentes tóxicos e contaminações, e as doses terapêutica e tóxica são bem estabelecidas, de modo a determinar de forma precisa a faixa terapêutica e as interações desse fármaco com os demais (MILLONIG; STADLMANN; VOGEL, 2005; CHAN et al., 2005; BERRIN et al., 2006).

Apesar do incentivo à prática da medicina tradicional por parte de órgãos oficiais como a OMS, as ações até agora têm sido mais no sentido do medicamento fitoterápico que das práticas populares em si, não recebendo então a devida atenção nem dos profissionais da área, nem da comunidade acadêmico-científica (FONTE, 2004). Dessa maneira, com dificuldade de acesso aos medicamentos alopáticos, grande parte da população faz uso de plantas medicinais, sem conhecer os eventuais riscos que o uso dessas plantas pode representar (FRANÇA et al., 2008).

É iminente a necessidade de mais pesquisas no campo da etnobotânica, especialmente no Brasil, visto que, é o país possuidor da maior biodiversidade do planeta, possuindo uma imensa flora com potencial farmacológico ainda carente de pesquisas (FONTE, 2004; ALVES et al., 2007). Os mesmos autores também salientam que apenas 25 dos 191 países que fazem parte da OMS têm desenvolvido políticas referentes à medicina tradicional, sendo que o Brasil não figura neste pequeno grupo.

Além da questão social, a pesquisa de novos fármacos de origem natural também atende a uma mudança que sutilmente vem ocorrendo no mercado, no qual os consumidores têm preferido as substâncias naturais às sintéticas, seja como tratamento principal, seja como auxiliar à alopatia, por

perceberem-nas menos agressivas ao organismo (TARTUF; MARTÍNEZ; STASHENKO, 2005; FRANÇA et al., 2008).

O potencial das plantas superiores como fonte de medicamentos é pouco explorado, estima-se a existência de 250.000-500.000 espécies de plantas no mundo, sendo que o estudo fitoquímico foi realizado em apenas uma minúscula parcela de Hamburger; Hostettmann, (1991 *apud* SOFIATI, 2009).

A planta *Synadenium carinatum* (Euphorbiaceae) é comumente utilizada como planta ornamental no Brasil, e o preparo aquoso com seu látex é usado na medicina popular contra várias doenças, tais como inflamações, doenças alérgicas e principalmente contra câncer, não havendo nenhuma comprovação científica de suas ações terapêuticas (SOUZA et al., 2005; ROGÉRIO, 2007). É popularmente conhecida no Brasil como “cega-olho”, vem sendo usada pela medicina popular há muitos anos podendo conter látex extremamente cáustico para pele e mucosa, e quando ingerido, pode causar distúrbios digestivos e depressores do sistema respiratório e cardiovascular, além de insuficiência renal (OLIVEIRA et al., 2005; MARIZ et al., 2006).

Há diversos estudos publicados sobre outros gêneros da mesma família; esses estudos mostram a presença de compostos químicos biologicamente ativos variados, tais como terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogénéticos e taninos. Entre esses, chamam a atenção alguns diterpenos (tiglianos, ingenanos e dafnanos), os quais produzem, além de efeitos urticantes, alguns tipos de câncer, ao mesmo tempo em que inibem outros, ação que, a princípio, acredita-se ser determinada pela sua concentração (BITTNER et al., 2001). Estudos recentes realizados com a espécie demonstraram um grande potencial imunomodulador de um componente isolado a partir de seu látex, uma lecitina (AFONSO-CARDOSO, 2007; ROGÉRIO, 2007).

Sabe-se que a população faz uso do látex na sua forma “integral” (sem qualquer processo de purificação, da maneira como é extraído da planta); dessa maneira, pode-se dizer que há mais substâncias além desta lecitina já isolada, as quais podem atuar de maneira conjunta, produzindo os efeitos

benéficos sobre a saúde humana observados naqueles que dele fazem uso. Esta afirmação se baseia no princípio da ação sinérgica dos compostos químicos, neste caso, metabólitos secundários do vegetal, significando que diferentes compostos químicos têm uma mesma atividade que atuam de forma conjunta, potencializando os efeitos uns dos outros (YUNES et al., 2001). Assim, embora o isolamento e identificação dos compostos químicos vegetais sejam de extrema utilidade, é preciso lembrar que muitas vezes – no caso de fitoterápicos – não é necessariamente aquela substância isolada a mais útil para o tratamento da doença: exemplo disto é o caso relatado por Id (2001 *apud* MACHADO, 2008), em que o grupo de pesquisa isolou e identificou duas espécies químicas a partir do vegetal *Croton urucurara*, sendo que nenhuma das duas isoladamente teve o mesmo desempenho do extrato na forma “integral”, ou seja, como é utilizado pela população, nos modelos biológicos testados.

Id (1998 *apud* MACHADO, 2008), demonstrou que a espécie *Synadenium grantii* não possui a ação antiulcerativa indicada pela medicina popular, entretanto Premaratna, Shadaksharaswamy e Nanjappa (1981); Rogero, Lugao e Ikeda (2003) observaram a ação benéfica de lecitinas encontradas no látex da mesma espécie sobre o sistema imunológico.

Alheia a isso, a população continua fazendo uso indiscriminado de plantas do gênero *Synadenium* (AFONSO-CARDOSO et al., 2007), podendo se tornar até mesmo um sério problema de saúde pública, devido ao desconhecimento da composição química da planta, o que pode implicar em intoxicações e alergias, além do próprio problema da automedicação.

Estima-se que existam de 25.000 a 75.000 espécies vegetais utilizadas nas medicinas tradicionais do mundo, das quais apenas 1% é conhecida por estudos científicos, com demonstração de seu valor terapêutico, quando administradas em seres humanos (PRIMACK, 1993).

2.2 Botânica, aspectos biológicos, bromatologia e fitoquímica da espécie *Himatanthus drasticus*.

2.2.1 Família Apocynaceae

A família Apocynaceae Jussieu (1789), de acordo como o novo sistema de classificação botânica, APG II, que considera características filogenéticas e não apenas morfológicas, é classificada nos seguintes clados, em ordem decrescente: Angiospermas → Eudicotiledôneas → Núcleo Eudicotiledôneas → Asterídeas → Euasterídeas, na ordem Genianales (The Angiosperm Phylogeny Group, 2003). As folhas são opostas com estípulas rudimentares, inteiras, quase sempre com glândulas ou emergências glandulares na base do limbo ou no pecíolo. As flores podem ser pequenas ou grandes e vistosas, tipicamente pentâmeras e hermafroditas. Os frutos se apresentam como um par de folículos, baga, cápsula ou dois mericarpos indeiscentes (BARROSO, 1991; JOLY, 1998; EVANS, 2002).

No Brasil, ocorrem cerca de 376 espécies subordinadas a 41 gêneros (BARROSO, 1991), destacando-se espécies do gênero arbóreas de *Aspidosperma*, fornecedora de madeira para carpintaria, os representantes ornamentais de *Tabernaemontana*, *Plumeria*, *Amsonia*, *Nerium* e *Vinca*, espécies de pequeno porte de *Mandevilla* e *Thevetia*, e as trepadeiras dos gêneros *Allamanda* e *Peltastes* (JOLY, 1998; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Segundo levantamento de Takeda; Farago (2001), *Forsteronia* e *Mandevilla* são gêneros encontrados no Parque Estadual de Vila Velha no Paraná, Brasil.

A família Apocynaceae pode ser considerada uma das maiores fontes vegetais de constituintes químicos de utilidade na medicina moderna. Várias substâncias têm sido isoladas a partir de espécies do táxon, e muitas delas representam protótipos de classes farmacológicas distintas de fármacos e fazem parte da história da farmacologia e da terapêutica, por exemplo, o isolamento de alcalóides dos gêneros *Rauvolfia*, *Vinca*, *Catharanthus* e *Alstonia* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Esta família é bem representada na flora brasileira e, particularmente, no Rio de Janeiro; segundo levantamento realizado por Novaes; Rapoport (1996) são encontradas cerca de 80 espécies. É conhecida popularmente como tiborna, jasmim-manga e raivosa em Minas Gerais e Bahia, janaúba no Ceará, pau-de-leite no Piauí, joanaguba no Rio Grande do Norte, sucúba na Amazônia (PLUMEL, 1991). No Ceará, essa espécie ocorre com maior frequência na Chapada do Araripe, extremo Sul do estado, onde é explorada cotidianamente e sem controle por populares daquela localidade (MODESTO, 1997).

A casca é rugosa e exsuda um látex branco bastante utilizado na medicina popular, principalmente pelos habitantes da região de ocorrência (MODESTO, 1997; LORENZI; MATOS, 2008). O leite da janaúba tem uma longa história de emprego na cura do câncer no Nordeste, porém, quase sem registro na literatura (AMARO; D'ALESSANDRO; CASTRO JÚNIOR, 2006).

Estudos prévios com as espécies do gênero *Himatanthus* demonstraram atividade farmacológica contra o carcinoma nasofarínge epidermóide humano (PERDUE; BLOMSTER, 1978); antiinflamatória e analgésica (MIRANDA; AZZAM; SHIRAKO, 2000); antimicrobiana (SOUZA et al., 2004) e efeito gastroprotetor (BAGGIO et al., 2005).

2.2.2 Gênero *Himatanthus*: aspectos biológicos e farmacológicos

Os constituintes químicos da família incluem glicosídeos cardioativos e cianogênicos, saponinas, taninos, cumarinas, ácidos fenólicos, ciclitóis e triterpenóides. Constituintes da subfamília Plumerioideae incluem uma grande variedade de alcalóides indólicos, mais de 500 nos gêneros *Himatanthus*, *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Catharanthus*, *Hunteria*, *Pleiocarpa*, *Rauvolfia*, *Tabernaemontana* e *Voacanga* (EVANS, 2002).

Várias substâncias têm sido isoladas a partir desses gêneros, sendo que muitas delas representam protótipos de classes farmacológicas distintas, como os alcalóides de *Rauvolfia* (reserpina, ajmalicina, ajmalina, ajmalinina, serpentina e serpentinina), utilizados em casos de hipertensão e arritmias

cardíacas; os glicosídeos cardiotônicos de *Strophantus* (ouabaina, estrofantinidina e cimarina) e alcalóides antitumorais de *Vinca* e *Catharanthus* (vimblastina e vincristina) (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

A família apresenta cerca de 410 gêneros e aproximadamente 4.650 espécies entre lianas, árvores, arbustos, latescentes, ervas, subarbustos, trepadeiras e herbáceas, distribuídas, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (SIMPSON, 2006). No Brasil ocorrem aproximadamente 90 gêneros e 850 espécies, habitando diversas formações vegetais (SOUZA; LORENZI, 2005).

As espécies do gênero *Himatanthus* apresentam sua distribuição restrita à região neotropical ocorrendo desde o Panamá até o Sudeste do Brasil, tendo como limite Sul o trópico de Capricórnio. A maioria das espécies do gênero ocorre na região amazônica e no centro-oeste do Brasil, como a *Himatanthus sucuuba* (arbórea nativa). Enquanto, as espécies *H. drasticus* e *H. bracteatus* apresentam distribuição restrita ao Brasil, ocupando, respectivamente áreas do cerrado, campo rupestre, caatinga e de mata atlântica. Tradicionalmente empregam-se as folhas, caules ou cascas destes como antiinflamatórios, analgésico, e cicatrizante (CORRÊA, 1984; DI STASI; HIRUMALIMA, 2002; SPINA, 2004).

O gênero *Himatanthus* é representado por 13 espécies (PLUMEL, 1991), das quais cinco já foram estudadas do ponto de vista químico, cujos metabólitos mais isolados de *Himatanthus* e *Plumeria* são os iridóides, que são compostos monoterpênicos com a estrutura do núcleo do tetraidrociclopentano-pirano (KUBLINSKI, 2000; LIMA, et al., 2003;). Em *H. sucuuba*, Silva et al., (1998a); Miranda, Azzan e Shirako, (2000) caracterizaram a atividade antiinflamatória e analgésica dos iridóides e triterpenóides presentes na casca, caule e no látex. Silva et al. (1998b) avaliaram a atividade citotóxica seletiva do látex, indicando a presença de constituintes químicos com ação no reparo do DNA. C. Neto et al., (2002) mostraram que existem agentes antibacterianos no extrato etanólico que inibem o crescimento de *Clostridium histolyticum* e de *Bacteroides fragilis*.

Há poucas citações na literatura descrevendo a constituição química e as propriedades biológicas das espécies de *Himatanthus* (BARRETO et al., 1998, RATTMANN et al., 2005). O gênero destaca-se principalmente pela presença de alcalóides, iridóides e ésteres triterpênicos, isolados principalmente das cascas do caule, mas também presentes em menor quantidade no látex, nas folhas e nas raízes.

A plumericina e isoplumericina foram isoladas de *Plumeria multiflora* (LITTLE; JOHNSTONE, 1951), *Plumeria rubra* (ALBERS-SCHÖNBERG; SCHMID, 1961), *Himatanthus fallax* (ABDEL-KADER et al., 1997), *Himatanthus articulatus* (BARRETO et al., 1998) e *H. sucuuba* (SILVA et al., 1998c; WOOD et al., 2001). O ácido β -diidroplumericínico foi identificado em *H. phagedaenicus* (VELOSO; NAGEM; SCHALL, 1999), assim como ácido confluêntico e metilperlatólico em *H. sucuuba* (ENDO et al., 1994). Fulvoplumierina e plumierida são iridóides encontrados em *Plumeria acutifolia* (GRUMBACH; SCHMID; BENEZE, 1952; SCHMID; BENEZE, 1953; RANGASWAMI; RAO; SURYANARAYANA, 1961), *H. sucuuba* (PERDUE; BLOMSTER, 1978) e *Himatanthus obovatus* (LIMA et al., 2003).

2.2.3 Espécie *Himatanthus drasticus*

A *H. drasticus* é uma espécie arbórea que cresce até sete metros de altura, com folhagem densa nas extremidades dos ramos, folhas obovais, subcoriáceas, brilhantes, glabras, verde escuro, com ápice arredondado a obtuso e pecíolos curtos, possui flores brancas, aromáticas, fruto tipo folículo, em forma de chifre, medindo entre 15 e 20 cm de comprimento por 2,5cm de largura e sementes com alas concêntricas. A casca é rugosa e exsuda um látex branco bastante utilizado na medicina popular, principalmente pelos habitantes da região de ocorrência. Sua distribuição geográfica vai desde o Sudeste do Brasil até a Guiana Francesa e Suriname. No Brasil ocorre nos estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará, Paraíba, Piauí, Maranhão, Pará e Roraima (PLUMEL, 1991; MODESTO, 1997; LORENZI; MATOS, 2008).

O vegetal *H. drasticus*, como outras espécies do gênero *Himatanthus* foram escassamente relatadas em relação aos seus estudos fitoquímicos e suas atividades biológicas. Colares et al., (2008a) isolaram e identificaram do extrato etanólico da casca o triterpeno lupeolcinamato que provavelmente é uma substância com perspectivas de apresentar atividade antitumoral. Outro trabalho com ação farmacológica dessa espécie foi o efeito gastroprotetor do látex através de lesão gástrica induzida por etanol e indometacina (COLARES et al., 2008b). Já da espécie *H. succuba* foi isolado o iridóide fulvoplumierina que apresentou atividade contra carcinoma nasofaríngeo epidermóide humano (PERDUE; BLOMSTER, 1978).

Com relação às atividades biológicas, as espécies do gênero *Himatanthus* possuem diversas indicações populares para o tratamento de várias enfermidades, porém foram poucas estudadas cientificamente a fim de comprovar tais efeitos terapêuticos. O quadro 1 apresenta algumas espécies do gênero e atividades farmacológicas ou indicações populares relatadas na literatura científica.

Quadro 1 – Atividades farmacológicas e indicações populares de espécies do gênero *Himatanthus* registradas na literatura

ESPÉCIES	PARTE UTILIZADA	AÇÃO FARMACOLÓGICAS OU INDICAÇÃO POPULAR	REFERÊNCIAS
<i>H. attenuatus</i>	folhas	citotoxicidade contra células tumorais de leucemia promielocítica aguda	Suffredini et al. (2002).
		inibição da glucose-6-fosfatase em microsomos; diminuição da pressão arterial sem alteração da frequência cardíaca; letalidade significativa contra larvas de <i>Artemia salina</i>	Jiménes et al. (2002).
<i>H. bracteatus</i>	folhas	indicação indígena: antipirético	Castillo et al. (2007).
<i>H. drasticus</i>	látex	indicação popular: câncer de pulmão e linfático, vermes intestinais, febre, menstruação irregular, infertilidade feminina e úlceras gástricas	Lorenzi; Matos (2008).
<i>H. obovatus</i>	raízes	leishmanicida contra promastigotas de <i>Leishmania donovani</i>	Mesquita et al., (2005).
	folhas e caules	inibição da replicação de células sangüíneas mononucleares periféricas	Souza-Fagundes et al. (2002).
<i>H. sucuuba</i>	cascas do caule	indicação popular: gastrites, hemorróidas e anemia	Endo et al. (1994).
		feridas externas; aintibacteriana contra cepas de <i>Clostridium histolyticum</i> e <i>Bacterioides fragilis</i>	C. Neto et al. (2002).
		aumento da permeabilidade capilar	Vilegas et al. (1997).
		cititóxica contra linhagens de células tumorais	Wood et al. (2001).
		Inibição do MAO-B	Endo et al. (1994).
	látex	Anti-inflamatória, redução da formação de edema	Miranda et al. (2000).
	cascas e raízes	Inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos e de IFN- γ	Souza et al. 2006

2.2.4 Caracterização bromatológica

A bromatologia consiste no estudo dos alimentos, nas características de sua composição química e nas modificações de seus componentes durante o processamento (MARTINS, 2007). Desde 1864, o método usado para as análises que se fazem normalmente é o chamado Weende. Por esse método é que se tem a análise proximal dos alimentos. O Sistema de Weende, também chamado Sistema de Análise Proximal, foi criado por Henneberg em 1860 na Weende Experimental Station, na Alemanha. As técnicas ainda são quase as mesmas com exceção do nitrogênio, que é feito segundo o método de Kjeldahl (AOAC, 1975).

De acordo com Pereira, (2005), este é um dos maiores exemplos da inteligência humana, já que poucas tecnologias neste mundo permanecem sendo usadas por tanto tempo. As análises laboratoriais visam separar os componentes dos alimentos em frações de digestibilidade e metabolização previsível, a um custo analítico baixo e utilizando métodos rápidos.

Na análise da composição bromatológica são avaliados, principalmente, os teores de matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, matéria mineral, podendo-se inserir também, a análise da composição química que inclui os macro e microminerais, com destaque para o fósforo e o cálcio, principais minerais constituintes do corpo dos animais, entre outros. O teor de Matéria Seca (MS) é o ponto de partida da análise de forrageiras. É importante porque a preservação do alimento depende do teor de umidade nele existente, além de servir de base para comparar o valor nutritivo de diversos alimentos, de diferentes locais e épocas. Os demais constituintes são determinados com base no teor de matéria seca (SILVA; QUEIROZ, 2002). É de fundamental importância na nutrição porque, é também com base na MS, que se estabelece a quantidade de nutrientes necessária para manter, principalmente, a saúde, produção e reprodução animal promovendo a eficiência, evitando o uso demorado dos constituintes nutritivos na formulação da dieta (NRC, 2001).

A determinação do teor de Proteína Bruta (PB) inclui não somente a parte proteína verdadeira, mas todo o nitrogênio presente nos alimentos, e que é potencialmente transformado em proteína pelas bactérias do ambiente ruminal. A proteína é importante para a manutenção, crescimento e produção dos animais (NASCIMENTO et al., 1996). Baixo teor de PB na dieta prejudica a fermentação ruminal e a digestão de alimentos e, conseqüentemente, o consumo (KEMPTON; LENG, 1979).

De acordo com Milford; Minson (1966) o teor de PB inferior a 7% reduz o consumo voluntário da forrageira. Segundo Van Soest (1994) os ruminantes necessitam de, no mínimo, 6 a 8% de PB na dieta para manutenção da atividade microbiana no ambiente ruminal. Cabras leiteiras, em baixa produção, necessitam de 14% de PB na dieta, segundo Nunes (1985) de acordo com Morand-Fehr; Sauvant (1980) esta mesma categoria de animais com baixa produção necessita de 13% e, em alta produção, 16% de PB.

A matéria mineral (MM) dá a idéia da riqueza das forrageiras em minerais, mas não dá a idéia da quantidade de nenhum deles separadamente. As forragens possuem componentes minerais muito variáveis, por isso, muitas vezes, o teor de cinzas desses alimentos fornece pouca informação sobre a composição. Alguns alimentos de origem vegetal são ainda ricos em sílica, o que resulta em teor elevado de cinza. Entretanto, esse teor não representa nenhum valor nutritivo para os animais (SILVA; QUEIROZ, 2002).

A fibra em detergente neutro (FDN) é o componente que mais se aproxima dos conteúdos da parede celular, visto que, esta apenas não contém a pectina, que é removida durante o processo de determinação. Segundo Mertens (1983) a FDN, embora não sendo uma entidade quimicamente pura, é o componente que melhor representa os constituintes de baixa degradação da dieta. A Fibra em Detergente Ácido (FDA), quando utilizada na formulação de ração, pode levar a erros, em virtude desta não conter a hemicelulose, que é um componente de lenta digestão e presente de forma variável nos alimentos (RESENDE; QUEIROZ; FONTES, 1995).

O teor de FDN e FDA na composição bromatológica das forrageiras pode variar dentro de uma mesma espécie, principalmente, em conseqüência

da diferença entre estágio de desenvolvimento das plantas. Alimentos com mais de 25% de FDN são considerados volumosos (REID; KLOPFENSTEIN, 1983; LAVEZZO, 1988). Assim, a consideração da fração fibrosa das forragens é de fundamental importância para o acesso ao valor nutritivo desses alimentos para ruminantes, pois fornece quantidade significativa de energia a baixo custo e, por apresentar variabilidade naturalmente superior aos demais componentes químicos, portanto, deve ocupar posição central na avaliação de disponibilidade de energia (CONRAD et al., 1984).

2.3 Composição química de vegetais

Entende-se por metabolismo secundário de plantas, o conjunto de processos metabólicos que originam compostos que não possuem uma distribuição universal nos vegetais, por não serem necessários a todas as plantas (PERES, 2008). Diferente do primário, o metabolismo secundário não é essencial para o desenvolvimento do vegetal, mas é imprescindível para a sobrevivência de uma espécie dentro de um ecossistema, viabilizando a adaptação do indivíduo no ambiente, respondendo pelas relações e interações entre planta e ambiente (MONTANARI JUNIOR., 2002).

Esses metabólitos, além de muito diversificados, possuem interessantes propriedades biológicas. Muitas comercialmente importantes para os setores alimentício, agrônomo, de perfumaria e principalmente farmacêutico, o qual visa principalmente o grande número de substâncias farmacologicamente ativas (SANTOS, 2002).

2.3.1 Terpenos

Originam-se da via do acetato-mevalonato a partir de uma unidade de isopreno. São precursores de quatro classes hormonais de plantas, as citocininas (CKs), o ácido abscísico (ABA), as giberelinas (GAs) e os brassinoesteróides (BR). Sua classificação é feita de acordo com a quantidade

de unidades de isopreno em: hemiterpenóides (C5); monoterpenóides (C10); sesquiterpenóides, (C15); diterpenóides, (C20); triterpenóides, (C30) e carotenóides, (C40) (PERES, 2008).

Terpenos (ou isoprenóides ou terpenóides) formam uma subdivisão de classe dos prenil-lipídios (terpenos, prenilquinonas e esteróis), representando o grupo mais antigo de produtos de pequenas moléculas sintetizado por plantas e provavelmente o grupo mais difundido de produtos naturais. Terpenóides pode ser descrito como terpenos modificados onde são movidos ou removidos grupos metila, ou são adicionados átomos de oxigênio. Inversamente, alguns autores usam o termo “terpenos”, mais amplamente para incluir o terpenóides (VIEGAS JR., 2003).

Os terpenos apresentam grande variedade de estruturas químicas e diversas funções biológicas, com isso obtem-se propriedade fisico-química e atividades biológicas. A principal propriedade fisico-química é a solvência, apresentando constante dielétrica de 2,2 e 6,8. Outras atividades biológicas distribuem-se dentro de vários grupos, como bactericida, bacteriostática, fungicida, antiviral, antipatrasitária, inseticida e analgésica. Ademais, também são responsáveis pelas características aromáticas, na maioria dos produtos naturais (BRUNETON, 1991).

2.3.2 Compostos Fenólicos

Grupo pertencente a uma classe de compostos com estruturas bastante diversificadas e possuem pelo menos um anel aromático no qual, pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (OH-) (CARVALHO et al., 2002). Os compostos fenólicos tendem a se solubilizar em água e podem estar ligados a açúcares. São compostos instáveis, facilmente oxidáveis em pH alcalino. Do ponto de vista farmacológico possuem atividade anti-séptica, antiinflamatória e podem inibir atividade enzimática (BRUNETON, 1995). A ligação das hidroxilas com o anel aromático lhes confere poder anti-oxidante. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e

tocoferóis (ÂNGELO; JORGE, 2007). Esse grupo de compostos está largamente distribuído no reino vegetal, nos microorganismos e em menor quantidade no reino animal e podem ser classificados de acordo com sua ocorrência no reino vegetal, como:

- Compostos fenólicos amplamente distribuídos, como exemplo os derivados de ácidos benzóicos e de ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonóides e derivados de polimerização (taninos e ligninas);
- Compostos fenólicos de distribuição restrita, são em número reduzido, como exemplo os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona, o resorcinol e ainda os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina (CARVALHO et al., 2002; ÂNGELO; JORGE, 2007).

2.3.3 Alcalóides

Os alcalóides compreendem um grupo de metabólitos secundários incomparável a qualquer outro grupo de produtos naturais, apresentando uma grande diversidade estrutural, vias biossintéticas complexas e atividades farmacológicas terapeuticamente importantes (CORDELL, 1981). Geralmente, os alcalóides são compostos nitrogenados que possuem caráter alcalino e sua maioria são farmacologicamente ativos. No entanto, há algumas exceções, como é o caso da colchicina, do ácido aristolóquico e dos alcalóides quartenários que possuem caráter ácido (CORDELL et al., 2001). O caráter básico dos alcalóides depende da disponibilidade do par de elétrons, como os grupos alquila. A disponibilidade do par de elétrons no nitrogênio é maior e o composto torna-se mais básico. O contrário é observado quando um radical receptor de elétrons está ligado ao nitrogênio, como os grupos carbonita, consequentemente a disponibilidade do par de elétrons é menor e a basicidade diminui (CORDELL, 1981).

A definição mais aceita para alcalóides é a descrita por Pelletier, (1983) que diz que um alcalóide é uma substância orgânica cíclica, contendo um nitrogênio (N) em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é

limitada entre os organismos vivos. São compostos farmacologicamente ativos e encontrados predominantemente em angiospermas (HENRIQUES; KERBER; MORENO, 2002).

Os alcalóides são classificados de acordo com sua origem biossintética e com o sistema heterocíclico de anéis. De modo geral são formados a partir de aminoácidos (alcalóides verdadeiros, protoalcalóides e pseudoalcalóides). Os alcalóides verdadeiros são tóxicos exibem um amplo espectro de atividades fisiológicas, são quase invariavelmente básicos, normalmente contém um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico, são derivados dos aminoácidos, possuem distribuição taxonômica limitada e normalmente ocorrem em plantas como um sal de ácido orgânico. Os protoalcalóides também são originados de aminoácidos, porém o átomo de nitrogênio não está localizado em um anel heterocíclico, são básicos, e são conhecidos por aminas biológicas, como é o caso da mescalina e da efedrina. Os pseudo-alcalóides, por sua vez, não são derivados de um aminoácido precursor, mas geralmente são básicos, e compreendem o grupo dos alcalóides esteroidais (conessina) e dos alcalóides púricos ou metilxantinas (cafeína) (CORDELL, 1981; HENRIQUES et al., 2004).

Os alcalóides como agente farmacológico, juntamente com os terpenos, são os metabólitos secundários com maior potencial farmacológico e vários tem servido, e continuam servindo, como importantes ferramentas na elucidação de efeitos farmacológicos, respostas fisiológicas e mecanismos bioquímicos (DI STASI, 1996). Os alcalóides são caracterizados por suas ações agonistas e/ou antagonistas de receptores nicotínicos, muscarínicos, α - e β -adrenérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, GABAérgicos, e receptores de glutamato e opiáceos. Há ainda alcalóides que atuam sobre canais de potássio, sódio e cálcio; aqueles com atividade inibidora da acetilcolinesterase ou com atividade inibidora da reabsorção de neurotransmissores; assim como alcalóides que podem ligar-se ao DNA, afetando a síntese de proteínas (CORDELL; QUINN-BEATIE; FARNSWORTH, 2001).

A maioria dos alcalóides possui centros quíria únicos ou múltiplos, é extremamente rara a ocorrência de misturas racêmicas, possuem tipicamente peso molecular moderado (250 – 600 Daltons), e são passíveis de técnicas de purificação e análise espectral. A basicidade da maioria dos alcalóides permite que eles sejam mais solúveis em água, determinando uma maior biodisponibilidade, através da formação de um sal de alcalóide. A diversidade de grupos funcionais nas moléculas permite modificações que podem introduzir grupos capazes de modular a atividade farmacológica e de reduzir ou aumentar a lipofilicidade se necessário (CORDELL; QUINN-BEATIE; FARNSWORTH, 2001).

Os alcalóides indólicos mais encontrados em famílias de ordem Geniales – Loganiaceae, Rubiaceae, Naucleaceae e Apocynaceae, onde são observados principalmente alcalóides indólicos monoterpênicos. A ocorrência de alcalóides indólicos fora de ordem Geniales é bastante rara e, quando encontrados, são normalmente indólicos simples (SCHRIPSEMA; DAGNINO; GOSMANN, 2004).

2.3.4 Cumarinas

Constituem uma classe de metabólitos secundários derivados do ácido cinâmico, amplamente distribuídos no reino vegetal, podendo também ser encontrados em fungos e bactérias. A esses compostos atribui-se uma grande variedade de atividades biológicas, como a antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, antiespasmódica, antitumoral e antioxidante, as quais podem estar relacionadas com a inibição da atividade de enzimas, por exemplo, daquelas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, e com a sua atividade “scavenger” de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (SOARES; MACHADO, 2008).

2.3.5 Saponinas

São glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), o que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificante. Ação sobre membranas: muitas saponinas são capazes de causar desorganização das membranas das células sanguíneas (ação hemolítica) ou das células das brânquias em peixes (ação ictiotóxica); complexação com esteróides: razão pela qual freqüentemente apresentam ação antifúngica e hipocolesterolemiantes (SIMÕES et al., 2007).

2.3.6 Taninos

São polifenóis de origem vegetal, com pesos moleculares geralmente entre 500 e 3000 que inibem a ação de microorganismos patogênicos. O composto polifenólico contendo suficientes grupos hidroxila e outros (como carboxila) para poder formar complexos fortes com proteínas e outras macromoléculas. Os hidrolisáveis por ácidos ou bases fracos, produzindo-se carboidrato e ácidos fenólicos, enquanto os condensados (protoantocianidinas são polímeros de unidades flavonóides ligadas por ligações carbono-carbono). Na sua bioatividade apresenta ação antioxidante e sequestradora de radicais livres, complexação com macromoléculas, as seguintes aplicações farmacológicas anti-sépticos, antioxidantes, antidiarréico, adstringentes, cicatrizantes, hemostáticos, protetores e reepitelizantes (SIMÕES et al., 2007).

2.3.7 Cromatografia

Na caracterização fitoquímica de produtos naturais a cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas atualmente para o isolamento de metabólitos

secundários, sendo a cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada (CCD) aplicadas primeiramente na etapa de identificação (PEREIRA; AQUINO NETO, 2000). Esta técnica visa à separação de misturas em seus vários componentes. A separação cromatográfica líquido-sólido por CCD, que consiste na separação dos componentes de uma mistura pela migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície sólida. A CCD é uma das técnicas de separação mais amplamente utilizadas devido ao seu alto nível de reprodutibilidade, rapidez na separação, alta sensibilidade e por ser comparativamente mais viável economicamente (SANTOS et al., 2007).

Um dos problemas que continuamente desafiam os bioquímicos é a separação e a purificação de um ou mais compostos de uma mistura complexa. Cromatografia é um processo físico de separação, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: fase estacionária e fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico, passa sobre a fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura (PERES, 2002).

De maneira mais completa, a técnica baseia-se no princípio da adsorção seletiva (que não deve ser confundida com absorção), um tipo de adesão. A técnica foi descoberta em 1906 pelo botânico italiano naturalizado russo Mikahail Tswett, mas não foi largamente utilizada até os anos 30. Tswett separou pigmentos de plantas (clorofilas) adicionando um extrato de folhas verdes em éter de petróleo sobre uma coluna com carbonato de cálcio em pó em um tubo de vidro vertical. Enquanto, a solução percolou através da coluna os componentes individuais da mistura migraram para baixo em taxas diferentes de velocidades e então a coluna apresentou-se marcada com gradientes horizontais de cores. A esse gradiente deu-se o nome de cromatograma (STROBEL, 1973).

Esta separação depende da diferença entre o comportamento dos análitos entre a fase móvel e a fase estacionária. A interação dos componentes da mistura com estas duas fases é influenciada por diferentes forças

intermoleculares, incluindo iônica, bipolar, apolar, e específicos efeitos de afinidade e solubilidade (VOGEL, 2002).

A seleção do tipo de cromatografia adequada depende dos materiais a serem isolados e, freqüentemente, diversos métodos cromatográficos podem ser usados seqüencialmente para que seja obtido um composto na forma pura. (PERES, 2002). Como uma alternativa da técnica em coluna, pode realizar a cromatografia em uma folha ou tira de papel adsorvente. Para várias finalidades, deve-se preferir papel de filtro celulose. É tão hidrófilo que normalmente mantém um revestimento de água (totalmente imperceptível) adsorvida do ar. Portanto, a cromatografia em papel de filtro é quase sempre uma partição, um exemplo de cromatografia líquido-líquido. Essa é uma técnica de partição que utiliza dois líquidos (líquido-líquido) sendo um fixado em um suporte sólido (papel de filtro). Útil em separação de compostos polares. Encontra-se bastante difundida devido à sua facilidade experimental e ao seu baixo custo (STROBEL, 1973; EWING, 1982). A cromatografia em papel (CP) é uma das técnicas mais simples e que requer menos instrumentos para sua realização, porém é a que apresenta as maiores restrições para sua utilização em termos analíticos (PERES, 2002).

Na cromatografia em camadas delgadas (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo está fundamentado, principalmente no fenômeno de adsorção (PERES, 2002).

2.4 Efeitos mutagênicos com uso de drogas químicas e plantas medicinais

A mutação é definida como qualquer alteração súbita hereditária, na seqüência ou no número de nucleotídeos do ADN de uma célula. Em geral, estas mudanças levam à expressão de proteínas estruturais ou enzimas com funções alteradas, sendo detrimenais para o indivíduo (BICUDO, 1987; BURNS; BOTTINO, 1991). Entretanto, em curto prazo e do ponto de vista de um único organismo, a alteração genética é quase sempre prejudicial,

especialmente em organismos multicelulares, nos quais a alteração genética está mais inclinada a perturbar o desenvolvimento e a fisiologia extremamente complexos e sintonizados de um organismo (ALBERTS, 2002).

Atualmente, qualquer mudança na condição hereditária de um organismo é chamada de mutação, podendo ocorrer nos genes ou nos cromossomos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Estas resultam tanto de fatores internos quanto externos (PIERCE, 2004). De acordo com Lima, (1996) além de ocorrerem espontaneamente, podendo ser induzidas por diversos agentes tais como: radiações ionizantes, radiações ultravioletas e substâncias químicas. Entre diversas substâncias, algumas são encontradas nos vegetais, sendo necessário estudar seu provável efeito mutagênico.

O Teste de Ames é muito utilizado no estudo de mutagênese. De acordo com Schmidt, (1975), trata-se de um método simples e seguro. Hedley et al., (1983) citam outras vantagens da utilização do teste de Ames, entre elas, as de que os micronúcleos podem ser observado ao longo de todo o ciclo celular e os parâmetros finais serão reconhecidos até mesmo por pessoal com pequeno treinamento formal em citogenética. O teste se caracteriza pela observação do efeito do agente químico em eritrócitos policromáticos (PCEs) anucleados, já que estes têm um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que eles contenham deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos recentemente induzidos (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Fenech, (1997) descreve esses micronúcleos como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal, que se formam durante a mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas, este são derivados de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal, dessa forma, representam perda de cromatina em consequência do dano cromossômico estrutural ou de danos no aparelho mitótico.

Os efeitos mutagênicos e teratogênicos em humanos provocados pela quinina são citados através das observações clínicas de malformações congênitas (KATZUNG, 1998). Além dos efeitos adversos, várias investigações

sobre os efeitos genotóxicos com o uso de nitroderivados em microorganismos e organismos superiores que revelam efeitos mutagênicos e clastogênicos (MELO; FERREIRA, 1996).

Para avaliação da atividade mutagênica existem diversos ensaios, contudo, destacam-se os estudos nos quais foram usados os ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* (*Salmonella*/microsome assay). É um teste que tem sido amplamente utilizado para identificar mutágenos entre substâncias puras, misturas complexas e amostras ambientais. Caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *S. typhimurium* sensíveis a substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens revertem seu caráter de auxotrofia para a síntese de histidina e passam a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido (ZEIGER, 2001; VARELLA et al., 2004). Várias substâncias mutagênicas primeiramente identificadas pelo teste de Ames mostraram-se carcinogênicas em ensaios com animais (MARON; AMES, 1983).

Ozaki et al., (2002) avaliaram a genotoxicidade do extrato dos frutos de gardênia, através do teste de Ames, empregando as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium*, com e sem ativação metabólica (S9). Os resultados demonstraram que o extrato não apresentou atividade mutagênica. *Rhizoma (Polygonati) odorati* é utilizada como erva medicinal chinesa há centenas de anos para tratar muitas doenças, em especial, a tuberculose e o diabetes. Chen et al., (2001) avaliaram a segurança do extrato hidroalcoólico de *R. (P.) odorati*, através do teste de mutação gênica reversa com *S. typhimurium*, utilizando as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102. Os resultados revelaram que, para as linhagens empregadas, o extrato analisado não induziu efeito mutagênico.

A preservação do meio ambiente e a prevenção dos efeitos danosos causados pelo seu uso não apropriado são preocupações cada vez maiores no mundo atual. A utilização cada vez mais acentuada de produtos como fármacos, agroquímicos, cosméticos, corantes e muitos outros, tem demonstrado aumento nas taxas de mutagênese ambiental (RIBEIRO et al.,

2003). Tais agentes mutagênicos invadem a célula e se dirigem ao núcleo causando alterações no material genético podendo desregular o ciclo celular, fazendo com que a célula se reproduza descontroladamente invadindo tecidos adjacentes, dando início à formação de tumores.

As mutações podem ser classificadas de diferentes maneiras dependendo do aspecto a ser focado. Nos organismos diplóides como os eucariotes, ou os merodiplóides nos procariotes, as mutações podem ser classificadas como dominantes ou recessivas em função da expressão ou não do fenótipo alterado, respectivamente. Mutações podem ter natureza estrutural (incidem sobre um gene estrutural) ou reguladora, onde a sua expressão é detectada pela inabilidade em controlar outro gene. Mutações podem também ser classificadas como letais, quando os portadores não sobrevivem, ou ainda somática ou germinativa, estas últimas sendo transmitidas para gerações futuras. Quanto ao tipo de alteração no ADN as mutações podem ser classificadas em três grupos gerais: (i) gênicas ou pontuais, (ii) cromossômicas, e (iii) genômicas (GARDNER; SNUSTAD, 1986; BURNS; BOTTINO, 1991).

As mutações pontuais são aquelas que envolvem alterações na seqüência de nucleotídeos em um ou mais de um códon e podem ocorrer pela substituição de bases, deleção ou adição de uma ou mais bases. A mutação-tipo troca de base que levam à modificação de um códon pela substituição de um aminoácido distinto daquele presente na proteína original são chamadas de mutações de troca de sentido, enquanto geram um dos três códons de terminação, interrompendo precocemente a tradução, são denominadas mutações sem sentido. As mutações de troca de base podem ainda ser divididas em transições (troca de uma purina por outra purina ou troca de uma pirimidina por outra pirimidina) ou transversais (troca de uma purina por pirimidina ou vice-versa). As mutações por adição ou deleção de bases acarretam em mudanças do referencial de leitura na tradução, alterando a composição de aminoácidos de toda a proteína a partir do ponto onde ocorreu a mutação, sendo chamadas de mutação de troca de referencial ou "frameshift" (BICUDO, 1987; HENRIQUES; QUEROL, 1987).

Mutações pontuais, como a troca de bases e mudanças de

referencial, causam alterações relativamente pequenas no ADN e são detectáveis apenas pelos efeitos na expressão do gene alterado, levando as mudanças no fenótipo correspondente. Quando a mudança altera a atividade bioquímica da proteína, pode ocorrer uma mutação fenotípica, como no caso da hemoglobina na anemia falciforme e, da insulina no diabetes (VILLA; BRENTANI, 1987; HENRIQUES; QUEROL, 1987; BURNS; BOTTINO, 1991).

Mutações cromossômicas são conhecidas pelas alterações grosseiras na estrutura dos cromossomos sendo usualmente detectadas pelo exame microscópio de células em metáfase e envolvem quebras, e eventualmente reunião de material cromossômico durante o ciclo celular e incluem as inversões e translocações. As alterações encontradas são de dois tipos: cromossômicas e cromatídicas, dependendo da fase do ciclo celular no qual ocorre a mutação. Se a mutação ocorre nas fases G₀, G₁ e no começo da fase S, a aberração será do tipo cromossômica (EVANS, 1984). Há diferentes esquemas para classificar os diferentes tipos de aberrações (SAVAGE, 1988; OMS, 1985). O importante é que os diferentes tipos de aberrações (gap, isso gap, fragmento acêntrico simples, fragmento acêntrico duplo, quebra cromossômica, quebra cromatídica, anel e rearranjo cromossômico, células pulverizadas) sejam analisados e apresentados separadamente, calculando-se a frequência de aberrações por células e para cada tipo de aberração (ADLER, 1984; PRESTON; DEAN; GALLOWAY, 1987; BURNS; BOTTINO, 1991).

Mutações de origem exógenas estão relacionadas com danos no ADN causados pelos chamados agentes mutagênicos, definidos como elementos físicos (por exemplo, irradiação eletromagnética com luz ultravioleta, raios X, gama e alfa, choque térmico e campos magnéticos), químicos (agentes alquilantes, análogos de base, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, e outros) ou biológicos (certos vírus) capazes de causar danos ao ADN levando ao surgimento de mutações (SINGER; GRUBER, 1983; DRAKE, 1989; BRUSICK, 1994). Os agentes mutagênicos, em geral, causam um aumento na taxa de mutação de todos os genes de uma célula (BURNS; BOTTINO, 1991). Os agentes mutagênicos ambientais são de particular interesse, pois, a eles estamos constantemente expostos, como os poluentes que estão no ar, água e

alimentos, aumentando consideravelmente os riscos de indução de mutações e câncer no homem e nos animais (GUTERIDGE, 1992; HARMAN, 1992; VIJG; GOSSSEN, 1993; KING; GILLESPIE; MCKENNA, 1994).

2.5 Testes citogenéticos para a determinação da genotoxicidade

Os testes citogenéticos em roedores são os mais utilizados por se aproximarem mais de um resultado ideal no que se refere à avaliação da mutagenicidade de agentes genotóxicos e sua extrapolação para outras espécies animais inclusive para o homem. A proximidade filogenética, a natureza das células, a presença de processos fisiológicos (metabolismo) atuando na absorção, distribuição, ativação e excreção da droga fazem destes testes os paradigmas dos ensaios toxicológicos e genotóxicos (MATTER; TSUCJIMOTO, 1980; CARANO; NATARAJAN, 1988).

O exame microscópico dos cromossomos para a detecção de aberrações estruturais, alterações numéricas e troca de cromátides irmãs são os procedimentos melhor estabelecidos para a avaliação dos efeitos genotóxicos de drogas sobre as células de mamíferos (PRESTON; DEAN; GALLOWAY, 1987; CARANO; NATARAJAN, 1988).

Nos ensaios citogenéticos *in vivo*, os camundongos são inoculados com a droga a ser testada e, depois de completado o ciclo celular, as células da medula óssea, baço, rins, fígado, gônadas, ou órgãos fetais são removidos e analisados quanto à sua incidência de lesões cromossômica em microscopia ótica. Análises citogenéticas são realizadas através do monitoramento de aberrações cromossômicas de células em metáfase, oriundas de quebra nos cromossomos ou cromátides, rearranjos ou perda de fragmentos ou cromossomos inteiros, ou pela frequência de micronúcleos (PRESTON DEAN; GALLOWAY, 1987).

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO BROMATOLÓGICA E ANÁLISE FITOQUÍMICA DO VEGETAL *Himatanthus drasticus* PLUMEL (APOCYNACEAE) DA MESORREGIÃO LESTE MARANHENSE

BROMATOLOGICAL CHARACTERIZATION AND PHITOCHEMICAL ANALYSIS OF VEGETABLE *Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL (APOCYNACEAE) OF THE MIDDLE REGION, EAST OF MARANHÃO

Hildecy Silva da Luz¹; Ana Clara Gomes dos Santos²

RESUMO

O uso indiscriminado do vegetal *Himatanthus drasticus* por pequenos criadores foi o que objetivou a realização do estudo bromatológico e a fitoquímica do vegetal. Cascas da janaúba foram coletadas na mesorregião Leste do Maranhão e foram conduzidas aos laboratórios para a identificação botânica, bromatologia e fitoquímica pela metodologia da Prospecção Preliminar e CCD, realizando testes para as diversas classes de metabólitos secundários. Os resultados da bromatologia foram: matéria seca - (MS) (92,01%), matéria mineral - (MM) (3,75%), proteína bruta - PB (4,02%), extrato etéreo - EE (3,08%) e fibra em detergente neutro - FDN (51,35%). Os testes fitoquímico foram considerados positivos por reações de precipitações, coloração, formação de espuma e por formação de manchas coloridas na placa cromatográfica. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o vegetal apresenta teor de gordura baixo e não deve ser utilizado como forrageira na alimentação animal, entretanto poderá ser utilizado como volumoso pela presença de carboidratos fibrosos. As classes de metabólitos secundários que apresentaram maior expressividade são os alcalóides e taninos, quando analisadas por Prospecção e flavonóides e terpenos quando analisadas por CCD, com isso o *H. drasticus* (Janaúba) apresenta elementos indicativos de ação farmacológica.

Palavras-chaves: Bromatologia, Fitoquímica, *Himatanthus drasticus*, Maranhão.

¹ Mestranda Curso de Ciência Animal/UEMA

² Bolsista Fixação de Doutor/Ciência Animal/UEMA.

ABSTRACT

The indiscriminate use of the vegetable *Himatanthus drasticus* by small farmers motivated the bromatological study of it and the phitoclinical one of this vegetable. Crusts of Janaúba were collected in the middle region East of Maranhão and were conducted to the laboratories for botanical identification, also bromatological and phitoclinical ones by the methodology of the Preliminar Propection and CCD. It was performed tests to the several classes of metabolites secoudary the results of bromatology were dry material –(MS) (92,01%), mineral material – (MM) (3,75%) brute protein – PB(4,02%) ethenal extract – EE (3,08%) and fiber in nustral detergent – FDN (51,35%), the phitochemical tests were considered positive because of reactions by precipitations, coloration, formation of foam and by formation of colourful stains in the chromatographical plaque. Because of those results the paper concludes that the vegetable presents low grease terior and shal not be used live an animal feed, however it can be used like a bulky way because of the presence of fiberful carboidrats, the classes of secoudny metabolites which presented a major expressivity are the alkaloids and tanings, when analysed by Proception and flavonoids and terpens when analysed by CCD. Therefore the H drasticus (Janaúba) presents indicative elements of pharmacological action.

Keywords: Bromatology. Phitochemis try. *Himatanthus drasticus*. Maranhão.

1 INTRODUÇÃO

A família Apocynaceae Jussaeu (1789) pode ser considerada uma das maiores fontes vegetais de constituintes químicos de utilidade na medicina moderna. Várias substâncias têm sido isoladas a partir de espécies do táxon. Muitas delas representam protótipos de classes farmacológicas distintas de fármacos e fazem parte da história da farmacologia e da terapêutica. O isolamento de alcalóides de plantas pertencentes aos gêneros *Rauvolfia*, *Vinca*, *Catharanthus* e *Alstonia* são exemplos que podem ser citados (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

A família Apocynaceae compreende aproximadamente 250 gêneros presentes em duas subfamílias, Apocynoideae e Plumerioideae e 2000 espécies, distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta. São plantas de hábito variado, ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras encontradas na flora brasileira e, particularmente, no Rio de Janeiro; segundo levantamento realizado por, Novaes; Rapoport (1996), existindo cerca de 80 espécies. O vegetal *H. drasticus* é conhecido popularmente como tiborna, jasmim-manga e raivosa em Minas Gerais e Bahia, janaúba no Ceará, pau-de-leite no Piauí, janaguba no Rio Grande do Norte, sucúba na Amazônia (PLUMEL, 1991).

No Ceará, a espécie *H. drasticus* ocorre com maior frequência na Chapada do Araripe, extremo Sul do estado, onde é explorada cotidianamente e sem controle por populares daquela localidade (MODESTO, 1997). Conhecida como Janaguba, trata-se de uma planta muito comum em alguns estados do Nordeste do Brasil e Amazônia. Pertencente à família Apocynaceae, seus galhos e troncos produzem um látex muito comercializado na região do Cariri. De acordo com o uso medicinal popular local, o látex, assim como a casca e o caule são utilizadas como anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante (CORRÊA; 1984; PLUMEL; 1991; MODESTO; 1997; LORENZI DI STASI; HIRUMA-LIMA; 2002; MATOS; 2008).

A avaliação químico-bromatológica de uma planta é importante por fornecer uma descrição dos compostos que a formam, e assim oferecer um

direcionamento quanto às propriedades biológicas e/ou forrageiras das mesmas (COSTA, 2004). A concentração e disponibilidade dos nutrientes do vegetal permite avaliar a capacidade de suporte da pastagem e identificação das partes mais preferidas e consumidas pelos animais, destacando-se as carências alimentares ao longo do ano (VAN SOEST, 1994). Análises laboratoriais devem ser utilizadas para dar uma idéia aproximada do valor nutricional de determinada dieta, que é a mistura de todos os ingredientes oferecidos a um animal (BLOIS, 1958).

Trabalhos realizados sobre constituintes químicos da família Apocynaceae incluem glicosídeos cardioativos e cianogênicos, saponinas, taninos, cumarinas, ácidos fenólicos, ciclitóis e triterpenóides (EVANS, 2002). Os metabólitos mais isolados de *Himatanthus* e *Plumeria* são os iridóides, que são compostos monoterpênicos com a estrutura do núcleo do tetraidrociclopentano-pirano (KUBLINSKI, 2000).

Nas cascas do caule de *Himatanthus sucuuba* foram isolados os compostos iridoide alamandina, plumericina, isoplumericina, β -di-hidropulmericina, 15-desmetilisoplumierideo, plumerideo (iridoide majoritário no látex) e isoplumerideo (ENDO et al., 1994; SILVA et al., 1998; WOOD et al., 2001; MOREL et al., 2006; SOUZA et al., 2006; BARRETO et al., 2007; CASTILLO et al., 2007; SILVA et al., 2007), o triterpeno lupeol e os ésteres triterpênicos cinamato de lupeol, acetato de lupeol, β -fenilpropionato de lupeol, cinamato de α -amirina e cinamato de β -amirina (SILVA et al., 1998; WOOD et al., 2001; SOUZA et al., 2006). No látex de *H. sucuuba* foram identificados o polímero *cis*-poli-isopreno e os açúcares arabinose, glucose, xilose, ramnose e galactose (SILVA et al., 2003).

O látex de *H. drasticus* tem indicação popular contra o câncer de pulmão e linfático, vermes intestinais, febre e úlceras gástricas (LORENZI; MATOS, 2008). Estudos realizados por Mesquita et. al., (2005) nas raízes de *H. drasticus* indicaram que apresentam efeito leishmanicida contra promastigotas de *Leishmania donovani*. Estudos prévios com as espécies de *Himatanthus* demonstraram atividade farmacológica contra o carcinoma epidermóide nasofaringe de humano (PERDUE; BLOMSTER, 1978); antiinflamatória e

analgésica (MIRANDA et al., 2000); antimicrobiana (SOUZA et al., 2004) e efeito gastroprotetor (BAGGIO et al., 2005).

1.1 Justificativa

O uso do vegetal como medicinal pela população, a utilização na alimentação em animais de produção como controle de verminose e o fato de não haver estudos sobre a atividade com a espécie do gênero *Himatanthus* foi o que objetivou a realização da caracterização bromatológica e a fitoquímica para rastrear os possíveis grupos de compostos com algum tipo de bioatividade, quer seja tóxica, nos extratos analisados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do vegetal e local de processamento

A coleta de *H. drasticus* foi realizada nas áreas florestais do município de Caxias, MA, localizado nas coordenadas (latitude 4°51'32" S e longitude 43°21'22" O), altitude de 66m, em um ecossistema típico de cerrado, na mesorregião Leste Maranhense (IBGE, 2008). As folhas, sementes, frutos e casca do vegetal foram acondicionados em sacos de papel, enviadas aos laboratórios de Nutrição da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), de Botânica e de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campus Jaboticabal, (UNESP), São Paulo, SP, para identificação e processamento.

As cascas foram desidratadas à sombra em temperatura ambiente (27°C), acondicionadas em sacos de papel, para desidratação em estufa com triagem de ar úmido, à temperatura de 45°C por um período de 48 horas. A moagem foi realizada em moinho elétrico de facas, obtendo-se no final do processo a matéria-prima (pó), que foi pesada e acondicionada em sacos de papel e mantido em temperatura ambiente em local seco.

2.2 Botânica e Bromatologia

A identificação e classificação botânica do vegetal *H. drasticus* foi realizada através de chaves analíticas, comparações com as descrições e ilustrações da literatura específica, segundo a classificação padronizada por Spina, (2004) e Lorenzi, (1992), utilizando-se folhas, flores, frutos e sementes, sendo realizada no Laboratório de Botânica, Herbário Ático Seabra (UFMA), onde se encontra catalogada e depositada em exsicata sob o registro nº 01032.

A composição bromatológica foi realizada a partir de 500g do pó de *H. drasticus* (Janaúba) no laboratório de Nutrição Animal (UNESP). O teste foi

realizado em triplicata, para cada determinação do teor de: Cinzas, Matéria Mineral (MM), Fibra Bruta (FB), Lignina (L), Fibra em Detergente Neutro (FDN), Fibra em Detergente Ácido (FDA), Energia Bruta (EB cal/kg), Matéria Fibrosa (MF), Extrato Etéreo (EE), Extrato Nitrogenado (EN), Fósforo (Absorv Matéria Seca (MS) a 105° e Proteína Bruta (PB), segundo Van Soest (1967); PB (A.O.A.C., 1975) e EB (SILVA; QUEIROZ, 2002).

2.3 Análise fitoquímica

Os ensaios fitoquímicos foram realizados no laboratório de Produtos Naturais (UFMA). O Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHA) de *H. drasticus* (Janaúba) foi preparado segundo a metodologia proposta por Moreira, (1979) e modificada por Nakashima, (1993).

A partir do vegetal moído, desidratado e pesado (3 kg) foi realizado o preparo do extrato bruto (EB). O material foi colocado sob maceração a frio em uma mistura hidroalcoólica de EtOH: H₂O (7:3 v:v), e submetido a agitação mecânica esporádica.

A extração do macerado foi realizada mediante quatro trocas sucessivas a cada 24 horas com renovação do solvente, até a exaustão da extração, por um período de 96h. A somatória dos filtrados foi concentrada em evaporador rotativo de Southesher, obtendo-se assim o EBHA-Janaúba, separando-se uma alíquota e, transferido a um balão apropriado para ser concentrado em rotaevaporador até que seu volume fosse reduzido a aproximadamente um terço do original na concentração do extrato para diminuir a interferência deste no processo de particionamento. Determinou-se o peso seco e o rendimento.

Através da triagem fitoquímica da espécie *H. drasticus* (Janaúba) foram realizadas as determinações do resíduo seco e rendimento, principais grupamentos químicos, perfil cromatográfico do EBHA-Janaúba e dos subextratos, que foram utilizados eluentes no fracionamento aplicado em ordem crescente de polaridade em Coluna Cromatográfica (CC) de subextrato Acetato de Etila e o perfil Cromatográfico em Camada Delgada (CCD) das

frações do Subextrato Acetato de Etila (Tabela 1), de acordo com metodologia descrita por Matos, (1999).

Os Subextratos foram obtidos a partir do EBHA pelo processo de partição líquido-líquido, ETOH: H₂O (2:1, v:v). As misturas foram preparadas com solventes orgânicos de polaridades crescentes: hexano, acetato de etila e butanol. A extração foi realizada em funil de separação Todos os subextratos foram acondicionados sob refrigeração em frascos rotulados e devidamente fechados e denominadas de subextrato hexânico (S. He), subextrato acetato de etila (S. Ac.), subextrato butanólico (S. Bu) e subextrato aquoso (S. Aq).

Tabela 1 - Fracionamento em Coluna Cromatográfica do Subextrato Acetato de Etila de *Himatanthus drasticus* proveniente do município de Caxias, MA.

Eluentes	Proporções (v:v)	Frações coletadas
CHCl ₃ : MeOH	98:2	1-3
CHCl ₃ : MeOH	97:3	4
CHCl ₃ : MeOH	95:5	5
CHCl ₃ : MeOH	92:8	6
CHCl ₃ : MeOH	90:10	7
CHCl ₃ : MeOH	85:15	8
CHCl ₃ : MeOH	80:20	9
CHCl ₃ : MeOH	70:30	10
CHCl ₃ : MeOH	60:40	11
CHCl ₃ : MeOH	40:60	12
CHCl ₃ : MeOH	30:70	13
CHCl ₃ : MeOH	20:80	14 – 15
CHCl ₃ : MeOH	100	16 – 18
H ₂ O:MeOH	50: 50	19 – 20

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Botânica e Bromatologia

O vegetal foi identificado como pertencente ao Reino: Plantae, Família Apocynaceae Juss. 1789, Subfamília: Apocynoideae, Gênero: *Himatanthus* (Mart.) e Espécie: *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (1991), conforme as especificações de Spina (2004) que reportou sobre caracteres de morfologia e distribuição do gênero *Himatanthus* no Brasil, encontrado na região Nordeste, nos estados do Maranhão, Piauí, Alagoas e Bahia como áreas de ocorrência natural da espécie, também considerado o trabalho realizado por Linhares (2010) que verificou o gênero *Himatanthus* no município de Alcântara, MA, através da identificação do material botânico amplamente utilizada pela população devido às propriedades terapêuticas.

A casca da *H. drasticus* apresentou teores de MS de 92,01%, indicando uma perda de 7,99% de água. O teor de MM apresentado foi de 3,57%, porém, segundo a metodologia utilizada, a cinza diz pouco dos elementos minerais da forragem, pois vegetais possuem uma quantidade muito pequena de minerais, sendo muito variados. As cinzas apresentaram em pequena porção, resíduo mineral inorgânico que pode contribuir para a determinação de sais minerais, ou seja, através deste teor pode-se ter uma posição da fitodisponibilidade de metais neste vegetal. Os teores de PB, FDN, EB foram respectivamente 4,02%; 51,35% e 3643,31 (cal/g) (Tabela 2).

Tabela 2 - Teores médios (%) de Cinzas, MS, MM, FB, PB, P, EE, ENN, FDN, FDA, Lignina e EB (kcal/kgMS) de *Himatanthus drasticus* proveniente do município de Caxias, MA.

Índices	Resultados (%)
Cinzas	5,12
MS	92,01
MM	3,75
PB	4,02
MF	34,23
EE	3,08
ENN	46,93
FDN	51,35
FDA	38,86
Lignina	15,28
Fosforo (Absorvância)	0,059
Energia Bruta (cal/g)	3643,31

MS – matéria seca	EE – extrato etéreo
MM – matéria mineral	ENN – extrato não nitrogenado
PB – proteína bruta	FDN – fibra em detergente neutro
MF – matéria fibrosa	FDA – fibra em detergente ácido

3.2 Fitoquímica

O processo de triagem fitoquímica se baseia no princípio de que toda e qualquer substância presente na planta, independente da sua concentração, pode ser um princípio ativo (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

São inúmeras as metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um dos métodos considerados o mais adequado para a análise química farmacológica é a preparação de um extrato hidroalcolólico - etanol/água (YUNES, 2001).

O resíduo seco e rendimento para o Extrato Bruto (EB) e os subextratos obtidos a partir do EB apresentaram uma variação de 7,03 a 48%. O EBHA-Janaúba na concentração de 0,56g/mL se obteve 231,87g de massa e rendimento de 7,03%, esse rendimento encontra-se dentro da estimativa observada por Lino; Garrote, (2005) que relataram que geralmente a obtenção de extratos brutos apresenta uma variação de 3 a 10%. Entretanto, quando foi utilizado o S.Aq. o rendimento foi de 48%, a massa obtida apenas 4,8g, para

uma concentração de 0,16g/mL. No entanto, os demais subextratos verificou-se que houve uma variação em massa (g) de 0,72 a 2,27g e o rendimento entre 7,2 a 22,7% (Tabela 3). Esses baixos rendimentos costumam dificultar o teste de substâncias vegetais, pois tornam necessário usar grandes quantidades de material vegetal para o preparo dos extratos e subsequente fracionamento.

Tabela 3 - Peso Seco e Rendimento médio do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHA) e subextratos de *Himatanthus drasticus*.

Amostras	Concentração	Massa	Rendimento
	(g/mL)	(g)	(%)
EBHA	0,56	231,87	7,03
Subextrato Hexânico	0,02	0,72	7,2
Subextrato Acetato de Etila	0,04	1,35	13,5
Subextrato n-Butanol	0,07	2,27	22,7
Subextrato Aquoso	0,16	4,8	48

A triagem fitoquímica de *H. drasticus* evidenciou a presença de grupos de metabólitos secundários de interesse farmacológico, alcalóides de forma significativa na fração clorofórmica (F2) observados na reação de Meyer, em que houve formação de precipitado branco. As outras frações apresentaram resultado negativo. Esses resultados vêm corroborar com estudos já realizados anteriormente com o gênero *Himatanthus* através da quimiotaxia, revelando principalmente a presença de alcalóides e outros metabólitos na espécie da família Apocynaceae (KISAKUREK; HESSE; 1980; GRUPO, 1998; KAZMI, 1989; FRANCA; BROWN et al., 2000; MASSIOT; BOUMENDEL; 1992).

O perfil cromatográfico em CCD foi realizado a partir do EBHA-Janaúba para os subextratos de S.He., S.Ac., S.Bu. e S.Aq. no qual foi observado que a fase móvel utilizada foi eficiente apenas na separação das substâncias componentes do S.He, no entanto para a avaliação cromatográfica do EBHA e os demais subextratos foi necessário aumentar a polaridade da fase móvel de modo a promover uma melhor interação com as substâncias, permitindo assim o arraste delas ao longo da placa (Figura 1).

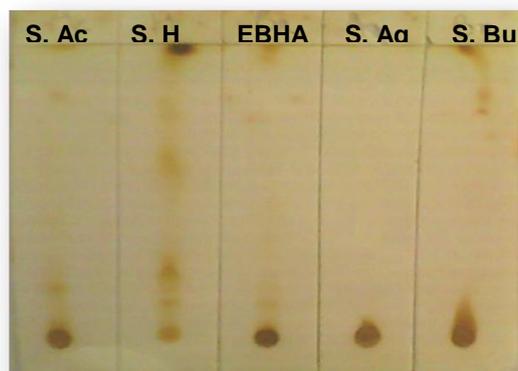


Figura 1 - Cromatogramas do EBHA de *Himatanthus drasticus* e Subextratos. Fase móvel: CHCl₃:MeOH (8,5:1,5 v:v). Revelação com vapores de iodo.

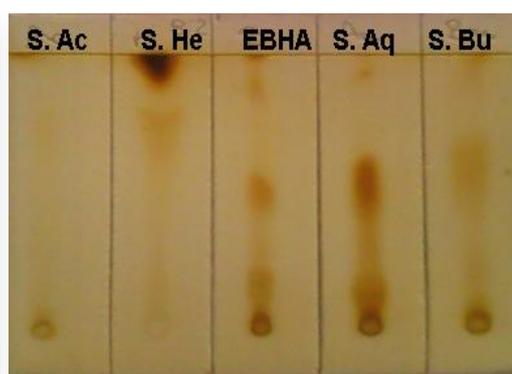


Figura 2 - Cromatogramas do EBHA e Subextratos. Fase móvel: CHCl₃:MeOH (8,0:2,0 v:v). Revelação com vapores de iodo.

Ao se utilizar a fase móvel com os mesmos solventes orgânicos ocorreu um aumento da polaridade da mesma. E, esse aumento da proporção de MeOH foi observado que, quando ocorrer a variação das proporções entre os solventes orgânicos utilizados na fase móvel é possível se obter uma melhor separação entre os compostos presentes em cada amostra estudada.

No cromatograma foi observada uma maior concentração relativa de componentes mais polares do que menos polares, notando-se que no S.Aq. e no S.Bu. o perfil cromatográfico é semelhante entre eles e também com a metade inferior do EBHA. Enquanto, no S.Ac. ocorreu menor quantidade de “manchas”, o que é um indicativo de pouca quantidade de substâncias componentes nessa fração, o que a torna uma primeira fração de interesse a ser fracionada na procura de frações mais limpas ou até de substâncias isoladas. Tomando como base essa avaliação cromatográfica preliminar foi possível escolher o melhor eluente para o fracionamento do S.Ac. por CC (Figura 2).

Nos resultados obtidos na triagem fitoquímica do EBHA e dos subextratos obtidos da casca de *H. drasticus* (Janaúba) foi verificado a presença de reações fortemente positiva para taninos, alcalóides, saponinas, triptenos e cumarinas. E, ausência de heterosídeos flavônicos e esteróides para o EBHA-Janaúba. Importante ressaltar que o alcalóide só foi encontrado no EBHA-Janaúba, demonstrando assim que o solvente ETOH é eficiente para partição desse metabólito; já nos demais subextratos esse elemento

metabólico secundário não foi observado. No S.Bu estavam presente com maior intensidade as saponinas e triperternos; enquanto, S.Aq apresentou somente as saponinas. Os esteróides só foram encontrado no S.He (Tabela 4).

Os terpenos estão envolvidos em diferentes funções nos vegetais, desde a composição de alguns óleos essenciais de plantas (monoterpenos), o que confere características como a atração de polinizadores; ação inseticida e antimicrobiana (sesquiterpenos), dentre outras (OLIVEIRA, 2007). As atividades biológicas de terpenos distribuem-se dentro de vários grupos. Devem ser citadas: bactericida bacteriostática, fungicida, antiviral, antiparasitária, inseticida, analgésica e aromáticas dos óleos essenciais derivados dos monoterpenos (VIEGAS Jr., 2003). Nesse estudo foi verificado apenas no EBHA-Janaúba e no S.Bu a presença de triterpenos (Tabela 4).

Comparando os resultados desta pesquisa com as análises fitoquímicas, realizadas através da técnica de CCD com *Himatanthus obovatus* coletadas no cerrado do município de Caxias, MA e Timon, MA foi observada a presença de esteróides, flavonóides, alcalóides, taninos e saponinas (SANTOS, 2002). Já Miranda et al. (2000) observaram frações hexânicas, triterpenos e iridóides nos extratos hidroalcoólicos obtidos das cascas e folhas de *H. succuba*.

Tabela 4 - Prospecção química do EBHA de *Himatanthus drasticus* e dos Subextratos.

Metabólitos Secundários	EBHA- Janaúba	Subextratos			
		S. He	S. Ac	S. Bu	S. Aq
Taninos	+++	-	++	++	++
Heterosídeos	-	++	++	++	++
Flavônicos					
Alcalóides	+++	-	-	-	-
Saponinas	+++	-	+	+++	+++
Triterpenos	+++	-	-	+++	-
Esteróides	-	+++	-	-	-
Cumarinas	+++	NR	NR	NR	NR

LEGENDA - presença da classe de metabólitos secundários indicada por:

+ : reação fracamente positiva
 ++: reação positiva
 +++: reação fortemente positiva
 Ausência indicada por:
 - : ausente

NR: não realizado
 EBHA-janaúba= estrato bruto hidroalcoólico
 janaúba
 S.He= subextrato hexânico
 S. Ac. =subextrato Acetado de Etila
 S.Bu= subextrato n-butanólico
 S. Aq. = subextrato Aquodo

Honda, (1990) no estudo de plantas em Mato Grosso do Sul realizou triagem fitoquímica de 100 espécies vegetais daquela região, dentre essas o gênero *Himatanthus*, utilizando a Técnica de Prospecção de constituintes químicos de extratos de plantas, não obtendo resultados positivos para a classe de metabólitos secundários de alcalóides.

Os testes para taninos foram considerados positivos pela formação de uma coloração verde ou azulada e pela formação de precipitado. A espécie vegetal apresentou taninos condensados, pela coloração verde característica na reação de sais de ferro para os subextratos S.Bu., S.Ac. e S.Aq. Os taninos são usados tradicionalmente na diarreia, hipertensão, reumatismo, hemorragias e em processos inflamatórios, possuindo atividades comprovadas tais como: bactericida, fungicida, antiviral, moluscicida e antitumoral (SIMÕES et al., 2007).

Os flavonóides encontrados em *H. drasticus* (Janaúba) constituem uma importante classe de polifenóis, presentes entre os metabólitos

secundários de vegetais, de acordo com as características químicas e biossintéticas relatadas por Ângelo; Jorge, (2007) sobre as diversas classes que constituem os flavonóides, como: chalconas, flavonóis, flavonas, dihidroflavonóides (flavanonas, flavanóides, antocianidinas, isoflavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis). Esse grupo pertence a uma classe de compostos com estruturas bastante diversificadas e possuem pelo menos um anel aromático no qual, pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (OH-) (CARVALHO et al., 2002).

Os S.Bu., S.Ac. e S.Aq. apresentaram flavanóis, pois houve o desenvolvimento de coloração vermelho alaranjada, o S.Ac também apresentou flavanonas, enquanto o S.Aq. apresentou uma coloração pardo-amarelada, evidenciando assim a presença de catequinas. O S.He. apresentou resultado positivo para flavonas, flavonóis e xantonas, pois houve o desenvolvimento de coloração amarela. Do ponto de vista farmacológico possuem atividade anti-séptica, antiinflamatória e podem inibir atividade enzimática (BRUNETON, 1985). A ligação das hidroxilas com o anel aromático lhes confere poder anti-oxidante.

A presença de alcalóides foi observada de maneira significativa no extrato bruto, na reação de Drangedorff, Mayer e Hager, pois houve a formação de precipitados floculoso ou turvação da solução. Nos demais subextratos apresentaram resultados negativos. Essa classe de compostos é conhecida pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos (PERES, 2008). Como exemplo desse potencial alucinógeno tem-se o alcalóide conhecido como DMT, N,N-dimetiltriptamina, presente em algumas plantas. Os alcalóides são classificados de acordo com sua origem biossintética. De modo geral são formados a partir de aminoácidos (alcalóides verdadeiros e protoalcalóides).

Apocynaceae é uma família caracterizada pela ocorrência frequente de estruturas alcaloídicas. Na literatura não há relatos para a presença deste composto para *H. succuba*. Entretanto, são comprovadas as atividades

gastroprotetivas para os alcalóides indólicos de *H. lancifolius* (BAGGIO et al., 2005). Rodrigues et al., (2006) observaram o predomínio de alcalóides, triterpenóides, compostos fenólicos e cumarinas entre as plantas indicadas como analgésicas por 26 etnias indígenas do Brasil.

Os S.Ac., S.Bu. e S.Aq. apresentaram resultados positivos para presença de saponinas. Estudos comprovam a ação das saponinas nas atividades antiinflamatórias, antihelmínticas e antivirais. Para saponinas os testes foram considerados positivos pela formação permanente de espuma ou colarinho, após a solução ser agitada. As saponinas, também chamadas saponosídeos, formam um grupo particular de heterosídeos derivados dos triterpenos tetracíclicos. O nome provém do fato de formarem espuma abundante quando agitadas na água, à semelhança do sabão. Esta propriedade decorre de sua estrutura química, na qual açúcares solúveis estão ligados a esteróides lipofílicos ou triterpênicos (HARBONE; BAXTER, 1995). Elas reduzem a tensão superficial da água, e causam, *in vitro*, a hemólise de eritrócitos. As saponinas, apesar de muito usadas na indústria farmacêutica, apresentam propriedades tóxicas aos seres humanos (VICKERY; VICKERY, 1981). Sua ação lipofílica facilita a complexação das saponinas com esteróides, proteínas e fosfolipídeos das membranas celulares alterando a permeabilidade das mesmas, ou causando sua destruição (SCHENKEI et al., 2001).

As reações para pesquisa de esteróides e triterpenos também apresentaram resultados interessantes nos S.He. e S.Bu.. Isso ocorre porque essa classe de metabólitos secundários tem maior afinidade, principalmente pelos solventes como o n-hexano e o n-butanol, sendo estes utilizados no presente estudo. Assim, os triterpenos e iridóides detectados nesse estudo nos extratos hidroalcoólicos corroboram com os descritos nas frações hexânicas do látex de *H. succuba* por Miranda et al., (2000) e das cascas do caule por Silva et al., (1998a). A comparação com o extrato bruto notou-se o surgimento de uma coloração verde ou azul após a reação de Liebrman-Burchard.

A pesquisa de cumarinas (cumarinas são lactonas do ácido o-hidróxi-cinâmico) para o EBHA-janaúba apresentou resultado satisfatório, do

ponto de vista da evidência da presença desses metabólitos, ocorrendo o desenvolvimento de fluorescência azulada forte.

Pode ser observado, que a triagem fitoquímica é coerente com o perfil cromatográfico avaliado em termos de uma maior presença relativa de componentes com maior polaridade, ressaltando que compostos como esteróides e triterpenos podem ser considerados como de baixa a média polaridade, compostos como os taninos, cumarinas e heterosídeos flavônicos de média para alta polaridade, e que as saponinas são de polaridade relativa alta. Analisando os cromatogramas de CCD foi possível observar que algumas frações apresentaram “manchas” com o mesmo deslocamento, o que sugere a possibilidade de reuni-las para assim obter frações semelhantes com maior massa (Tabela 5). O comportamento cromatográfico de algumas frações cujo polaridade da fase móvel empregada foi alta, ocorrendo o arraste das substâncias até o topo, havendo necessidade de diminuir a polaridade da fase móvel, ou seja, reduzindo a quantidade de MeOH e aumentando a de CHCl₃, como mostrado no cromatograma da figura 3.

Analisando-se o cromatograma foi possível observar que, com a diminuição da polaridade da fase móvel houve uma melhor separação das substâncias presentes nas frações, sendo que a fração FR8 apresentou um perfil cromatográfico interessante devido à presença de “manchas” com maior intensidade (mais concentradas), e um melhor deslocamento (melhor resolução) ao longo da placa (Figura 4).

Tabela 5 - Reunião das Frações do Subextrato Acetato de Etila

Frações	Reunião
1-3	FR-1
4-6	FR-4
8-9	FR-8
10-14	FR-10
15-19	FR-15

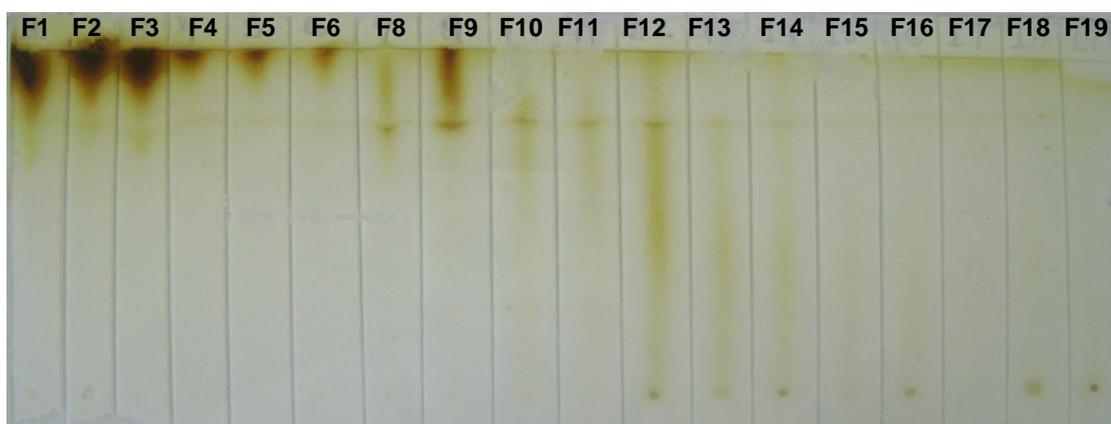


Figura 3 - Cromatogramas das frações 1-19 obtidas pelo fracionamento da Subextrato Acetato. Fase móvel: CHCl_3 : MeOH (7,5:2,5 v:v). Revelação com vapores de iodo.

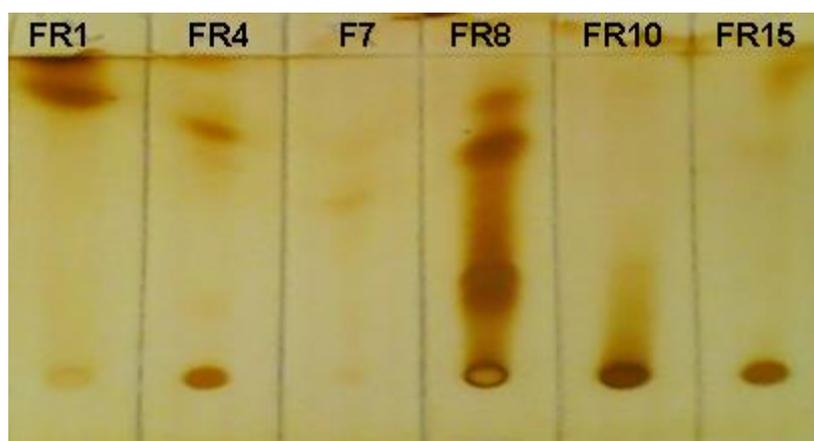


Figura 4 - Cromatogramas das frações reunidas pelo fracionamento do Subextrato Acetato. Fase móvel: CHCl_3 :MeOH (8,5:1,5 v:v). Revelação com vapores de iodo.

4 CONCLUSÃO

O estudo bromatológico da casca de *H. drasticus* indica a presença de alto teor de substâncias nutritivas, porém baixo índice de gordura e minerais.

A triagem fitoquímica do vegetal *H. drasticus* demonstra a presença de metabólitos secundários expressivos, tais como alcalóides, taninos, flavonóides, fenóis e triperpenóides, substâncias químicas com potencial farmacológico. Registrando pela primeira vez o estudo fitoquímico desse vegetal.

REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis**. Washington, 1975.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 1-9, 2007.

BAGGIO, C.H.; et al. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Planta Med.**, v. 71, n. 8, p. 733-738, 2005.

BARRETO, A.S. et al. Acido 15-desmetilisoplumierideo, um novo iridoide isolado das cascas de *Plumeria rubra* e do latex de *Himatanthus sucuuba*. **Química Nova**, n. 30, p. 1133-1135, 2007.

BARRETTO, V.C. et al. Eficiência de uso de boro no crescimento de clones de eucalipto em vasos. **Revista Scientia Forestalis**, Piracicaba, SP, n. 76, p. 21-33, dez. 2007.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, n.181, p. 1199-1200, 1958.

BRUNETON, J. Phenols and phenolic acids. In BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry and medical plants**. Lavoisier Press. EUA., 1995. p. 211-227.

CARVALHO, J.C.T., GOSMANN, G., SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade, 2002. p. 443-461.

CASTILLO, D. et al. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **J Ethnopharmacol**, n. 112, p. 410-414, 2007.

CECHINEL FILHO; YUNES, CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificações estrutural para a otimização da atividade. **Quim. Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

COSTA, M.L. Análise de alimentos. **Rehagro**, 2004. Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=473>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002.

ENDO, Y. et al. Confluent acid and 2'-O-methylperlatolic acid, monoamine oxidase B inhibitors in a brazilian plant, *Himatanthus sucuuba*. **Chem Pharm Bull**, n. 42, p. 1198-1201, 1994.

EVANS, W.C. **Trease and Evans' pharmacognosy**. 15. ed. Londres: Saunders, 2002.

FRANÇA, O.O.; BROWN, R.T.; SANTOS, C.A.M. Uleine and emethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 208-210, 2000.

GRUPO, L.R.P. **Contribuição ao estudo anatômico, fitoquímico e farmacológico de *Synadenium carinatum* Hook f. (Euphorbiaceae)**. 1998. 78 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

HARBONE, J.B.; BAXTER, H. **Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. London: Taylor e Francis, 1995.

HONDA, N.K. **Estudo químico de plantas de Mato Grosso do Sul I: triagem fitoquímica**. Campo Grande: EUFMS, 1990.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Divisão territorial do Brasil e limites territoriais**. 1 jul. 2008. Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Caxias_\(Maranh%C3%A3o\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Caxias_(Maranh%C3%A3o)). Acesso em: 10 jun. 2011.

KAZMI, S. N. et al. Plumerinine - a novel lupin alkaloid from *Plumeria rubra*. **Heterocycles**, Amsterdam, v. 29, n. 10, p. 1901-1906, 1989.

KISAKUREK, M.V.; HESSE, M. **Chemotaxonomic Studies of the Apocynaceae**. London: Academic Press, 1980.

KUBLINSKI, C. **Farmacognosia**: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega, 2000.

LINHARES, Jairo Fernando Pereira Linhares. **Sustentabilidade do sistema de extração de janaúba (*Himatanthus spp.*) no município de Alcântara, Maranhão, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade de Ecossistemas) - Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2010.

LINO, R.C.; GARROTE, C.F.D. Isolamento dos alcalóides indólicos presentes na casca do caule de *Aspidosperma subicanum* Mart., para obtenção de padrões com finalidade de desenvolvimento de metodologia para doseamento com marcadores de matéria prima vegetal. **Rev. Eletrônica de Farmácia**, n. 2, p. 107-109, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileira**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Plantarium, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

MASSIOT, G.A. BOUMENDEL. Alkaloids from *Alstonia undulifolia*. **Phytochemistry**, v. 31, n.3, p. 1078-1079, 1992.

MATOS, F.J.A. **Plantas da medicina popular do nordeste**: propriedades atribuídas e confirmadas. Fortaleza: EUFC, 1999.

MESQUITA, J.M.O. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.1, p. 6-12, 2005.

MIRANDA, A.L. et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta Med.**, n. 66, p. 284-286, 2000.

MIRANDA, G.J.; AZZAM, O; SHIRAKO, Y. Comparison of nucleotide sequences between Northern and Southern Philippine isolates of rice grassy stunt virus indicates occurrence of natural genetic reassortment. **Virology.**, n. 266, p. 26-32, 2000.

MODESTO, M.M.L.S. **Aspectos ecológicos e sócio-econômicos de *Himatanthus articulata* (Wahl.) Woodson. "janaguba" da Chapada do Araripe.** 1997. 55f. Monografia (Especialização em Botânica) - Universidade Regional do Cariri, Crato, 1997.

MOREIRA, E.A. Marcha sistemática de análise fitoquímica. **Trib.Farm.**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MOREL, A.F. et al. Study on the antimicrobial activity of *Himatanthus sucuuba*. **Fitoterapia**, n. 77, p. 50-53, 2006.

NAKASHIMA, T. **Étude phitochimique, evaluation des activités antifongiques et antivirales de trios Verbenaceae:** *Lippia alba* N.E. Brown, *Lippia multiflora* Mold. *Citharexylum myrianthum* Cham. 1993. Tese (Doutorado) – Institut National Polytechnique de Toulouse, França, 1993.

NOVAES, J. R. C.; RAPOPORTE, B. **Espécies coletadas no Estado do Rio de Janeiro depositadas no Herbário RB.** Rio de Janeiro: [s. n.], 1996.

OLIVEIRA, R. B. **Terpenos e terpenóides.** 2007. Disponível em: <www.geocities.com.br/plantas_toxicas>. Acesso em: 15 ago. 2011.

PERDUE, G.P.; BLOMSTER, R. N. South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocinaceae). **J. Pharm. Sci.**, v. 67, n. 9, p. 1322-1323, 1978.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário.** 2008. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp>>. Acesso em: 11 jun. 2011.

PETROVICK, P.R. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 4. ed. Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade, 2002.

PLUMEL, M.M. Le genre *Himatanthus* (Apocinaceae): révision taxonomique bradea. **Boletim do Herbarium Bradeanu**, Rio de Janeiro, v. 5, p.1-20, 1991.

RODRIGUES, E. Plants and animals utilized as medicines by the dwellers of the Jaú National Park (JNP) in Amazon forest, Brazil. **Phytother Res**, n. 20, p. 378-391, 2006.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS, 2002. p. 333-365.

SCHENKEL, E. P. et al. Plantas tóxicas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (EDS.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed Universidade UFRGS, 2001.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002.

SILVA, J. R. A. Quantitative determination by HPLC of iridoids in the bark and latex of *Himatanthus sucuuba*. **Acta Amazonica**, n. 37, p. 119-122, 2007.

SILVA, J. R. A. et al. Contribution to the study of *Himatanthus sucuuba*: latex macromolecule, microelements and carbohydrates. **Acta Amazonica**, n. 33, p. 105-110, 2003.

SILVA, J. R. A. et al. Contribution to the study of *Himatanthus sucuuba*: latex macromolecule, microelements and carbohydrates. **Acta Amazonica**, n. 33, p. 105-110, 2003.

SILVA, J. R. A. et al. Composição e atividades antiinflamatórias e analgésica do látex de *Hymatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson (Apocynaceae). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 5, 1998, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia: [s.n.], 1998. p. 89.

SILVA, J. R. A. et al. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**, p. 702-704, 1998.

SILVA, M.R.; SILVA, M.A.A.P.; CHANG, Y.K. Utilização da farinha de Jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) na elaboração de biscoitos tipo *cookie* e avaliação de aceitação por testes sensoriais afetivos univariados e multivariados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, jan./abr. 1998.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRG, 2007.

SOUSA, F. et al. **CO₂ soil degassing mapping**: a contribution to the volcanic risk assessment at Furnas Village (S. Miguel Island, Azores). [S. l.]: General Assembly da EGU, 2004.

SOUZA, M.S. et al. Inhibition of nitric oxide and interferon- γ production by iridoids and triterpenes from the roots of *Himatanthus sucuuba*. **Pharmacogn Mag.** n. 2, p. 216-219, 2006.

SPINA, A.P. **Estudos taxonômicos, micro-morfológico e filogenético do gênero Himatanthus Willd. Ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae)**. 2004. 197f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. New York: Cornell University Press, 1994.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 119-129, 1967.

VICKERY, M. L., VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. Hong Kong: The Macmillan Press Ltd., 1981.

VIEGAS JR., C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

WOOD, C. A.; LEE, K. et al. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. **Chem Pharm Bull**, n. 49, p. 1477-1478, 2001.

YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapeco: Argos, 2001.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TOXICOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCÓOLICO DE *Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL (APOCYNACEAE) EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS

EVALUATION OF TOXICOLOGICAL AND MUTAGENIC ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT HYDROALCOHOLIC *Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL (APOCYNACEAE) IN BONE MARROW CELLS IN SWISS MICE

Hildecy Silva da Luz ¹; Ana Clara Gomes dos Santos ²

RESUMO

Os metabólitos secundários contidos nas plantas medicinais podem ter ação toxicológica em animais. Com o objetivo de avaliar o potencial toxicológico causado pelo uso indiscriminado da Janaúba em pequenos ruminantes, cascas de *Himatanthus drasticus* (janaúba) foram coletadas na mesorregião Leste do Maranhão e conduzidas aos laboratórios para a identificação botânica. Foram feitas a partir do extrato bruto hidroalcólico (EBHA) de *H. drasticus* diversas concentrações para realização do Teste de Metáfase em células da medula óssea de camundongos e análise histopatológica dos órgãos vitais coletados durante a necrópsia após 24h da administração do EBHA-Janaúba. Os resultados demonstraram que EBHA-Janaúba apresenta discreta ação em células de medulas. Não foi evidenciada nenhuma alteração histológica de células teciduais de órgãos de eleição, considerando-se assim inócua ao uso do EBHA-Janaúba nas dosagens abaixo de 173.902mg (75%).

Palavras-chaves: Teste de metáfase, teste toxicológico, histopatológico, *Himatanthus drasticus*.

¹ Mestranda Curso de Ciência Animal/UEMA.

² Bolsista Fixação de Doutor/Ciência Animal/UEMA. E-mail: hildecy.luz@hotmail.com

ABSTRACT

The secondary metabolicals contained in the medical plants can be have their performance in animals. Aiming to evaluate the toxicological potential performance caused by the indiscriminated use of Janaúba in little ruminants, crusts of *Himantanthus drasticus* (Janaúba) were collected in the middle region East of Maranhão and conducted to the laboratories for botanical identification. It was made from the hydroalcoholic brute extract (EBHA) of *H. drasticus* several contractions to the making of the Metaphase test of the mice's bone marrow and histopathological analysis of the vital organs collected during the necropsy after 24 h of the administration of the EBHA – Janaúba, the results demonstrated that EBHA – Janaúba present discreet performance in marrow cells, there was not expressed any histological changes of tissue cells of organs of election, being considered so harmless to the use of EBHA – Janaúba in dosages below 173.902mg.

Keywords: Metaphase test. Toxicological test. Histopathological. *Himantanthus drasticus*.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente os estudos fitoquímicos abrangem a utilização de vegetais, e não apenas a plantas medicinais, para obtenção ou desenvolvimento de medicamentos, ou seja, como fonte de matéria-prima farmacêutica, também a descoberta de substâncias ativas de plantas como protótipo de fármacos, bem como o desenvolvimento de fitoterápicos (SIMÕES, 2001).

A vida dos organismos vivos depende das transformações químicas executadas pelos seus metabolismos primários e secundários. A bioquímica investiga a química de produtos naturais do metabolismo primário, que produz substâncias amplamente distribuídas nos seres vivos: aminoácidos, lipídios, carboidratos e macromoléculas. A química dos produtos naturais de metabolismo secundário é estudada por químicos orgânicos, reconhecidos como químicos de produtos naturais. O estudo dos constituintes químicos bioproduzidos pelo metabolismo secundário dos organismos vivos continua proporcionando a descoberta de diversas substâncias orgânicas, com atividades biológicas, que dependem da investigação farmacológica (BRAZ FILHO, 1994).

As espécies botânicas dos vegetais ocorrem em diferentes regiões e sua composição química também pode apresentar diferenças. As discrepâncias nos resultados das comparações qualitativas e até quantitativas dos metabólitos deve-se a aspectos relacionados o solo, clima, coleta de material, temperatura, reagentes químicos, dentre outros (MATOS, 1997).

As análises fitoquímicas fornecem informações relevantes à cerca da presença de metabólitos secundários nas plantas, para que assim possa chegar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos fitoterápicos. O método cromatográfico destaca-se entre os diversos métodos de análise como um dos mais frutíferos em resultados satisfatório e mais rico em número de variadas técnicas. Como processo de análise imediata tem permitido o fracionamento de misturas em seus componentes com maior

precisão e com menor consumo de tempo e trabalho, à medida que vêm sendo desenvolvidos novos materiais e novas técnicas (MATOS, 1997).

O potencial mutagênico de um agente químico pode ser determinado em laboratório, por testes que podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*, usando sistemas unicelulares ou sistemas mais complexos como ratos ou camundongos (RODRIGUES; CAMARGO, 2000), entre eles destaca-se o teste de micronúcleos em medula óssea de roedores *in vivo* (RIBEIRO, 2003) que além de atender às exigências dos órgãos nacionais que regulam os registros de produtos farmacológicos e químicos, também segue as recomendações do Gene-Tox Program da Environmental Protection Agency (MELO et al., 2009).

Os testes citogenéticos em roedores são os mais utilizados por se aproximarem mais de um resultado ideal no que se refere à avaliação da mutagenicidade de agentes genotóxicos e sua extrapolação para outras espécies animais inclusive para o homem. A proximidade filogenética, a natureza das células, a presença de processos fisiológicos (metabolismo) atuando na absorção, distribuição, ativação e excreção da droga fazem destes testes os paradigmas dos ensaios toxicológicos e genotóxicos (MATTER; TSUCJIMOTO, 1980; CARANO; NATARAJAN, 1988).

Muitas espécies vegetais foram avaliadas quanto a mutagenicidade, apresentando resultados negativos, como as aparas de bambu, que são as camadas intermediárias dos talos de *Bambusa tuldoides*, *Sinocalamus beecheyana* var. *pubescens* ou *Phyllostachys nigra*, Munro var. *henonis*, que são plantas perenes da família Gramineae. Elas têm sido usadas, principalmente, como medicamento tradicional chinês para reduzir ou curar dores de estômago, vômitos, diarreia, inflamações do tórax, inquietação ou sede excessiva. É reconhecido que há abundantes componentes biológicos ativos em aparas de bambu, tais como triterpenóides, saponinas e esteróis (CHEN et al., 2002).

Zhang et al. (2004) avaliaram a segurança do extrato aquoso de aparas de bambu, através do teste de Ames, utilizando as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, na ausência e presença de ativação metabólica (S9). A ausência de aumento no número de colônias

revertentes nas quatro linhagens da referida bactéria em todas as doses testadas, assim como ausência de relação dose-resposta evidente, indicaram que o extrato testado não apresentava atividade mutagênica. Frutos de *Gardenia jasminoides* (gardênia) são amplamente utilizados em países asiáticos como corante natural e como medicamento tradicional chinês.

Neste sentido, pode-se citar os estudos realizados com o látex da planta *Euphorbia milii* var. *hislopii*, syn. *Euphorbia splendens* var. *hislopii*, conhecida como “coroa de cristo” que segundo Vasconcellos; Schall (1986); Schall et al., (1992), pode ser útil como molusquicida no controle da esquistossomose, pois é ativa em concentrações muito baixas, é biodegradável e é facilmente cultivada em áreas endêmicas de esquistossomose, produzindo grandes quantidades de látex em todos os períodos do ano. Complementando estes relatos, o estudo toxicológico do látex de *E. milii*, realizado por Freitas et al., (1991) demonstraram que soluções aquosas dessa planta não são irritantes para a pele (em concentrações abaixo de 0,5%) e olhos de ratos (quando abaixo de 0,35%). Estudos quanto à citotoxicidade e genotoxicidade revelaram que o látex desta mesma planta não tem feito citotóxico em células CHO e não se apresentou mutagênico perante o teste de Ames (SCHALL et al., 1991).

1.1 Justificativa

O uso indiscriminado de *Himatanthus drasticus* (Janaúba) por pequenos e médios criadores de pequenos ruminantes como controle de verminose foi o que objetivou a realização da pesquisa, verificando o potencial toxicológico do vegetal *H. drasticus* através do teste de metáfase em células de medula óssea de camundongos e estudo histopatológico dos órgãos de camundongos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A identificação e classificação botânica do vegetal *H. drasticus* foi realizada no Herbário Ático Seabra, da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde se encontra depositada em exsicata sob o registro nº 01032.

A preparação do extrato bruto hidroalcoólico (EBHA) de *H. drasticus* (Janaúba) foi realizada a partir de 3 kg da casca do vegetal proveniente da mesorregião Leste Maranhense, segundo as coordenadas latitude 4°51'32" S e longitude 43°21'22" no laboratório de Produtos Naturais (UFMA). Após secagem do vegetal em estufa de ventilação forçada a temperatura constante de 45°C, moído em moinho tipo Willey® até extração do pó. O Extrato Bruto (EB) do vegetal foi macerado manualmente a frio em EtOH:H₂O (7:3, v.v) e mantidos sob agitação mecânica esporádica durante 24 horas com renovação do solvente por um período de 96 horas. Os filtrados foram concentrados em evaporador rotativo do tipo Southesher obtendo-se o EBHA-Janaúba. A análise fitoquímica foi realizada seguindo-se a metodologia preconizada por Matos (1998).

2.1 Teste de Metáfase

O teste de metáfase foi realizado em camundongos albinos Swiss, machos com 30 dias de vida, oriundo do Biotério (UFMA), mantidos em salas sob baixa temperatura a 22°C, acompanhamento diário, período de 10 dias no sistema *ad libitum*, rotina com a metodologia viviseccionista como execução e padronização do manejo nutricional e higienico, eliminando assim qualquer agravo.

Os animais foram distribuídos em grupos(G) de seis, sendo três em cada gaiola, enquanto o GVI (controle) apenas com três animais, mantidos sob o mesmo sistema, considerando-se às concentrações do EBHA-Janaúba e peso dos animais. A partir de 231.87g de rendimento bruto do extrato EBHA-Janaúba realizou-se as seguintes concentração de 231.870mg considerado

como GI (100%), 173.902mg (GII = 75%), 115.935mg (GIII = 50%), 57.937mg (GIV = 25%), 23.187mg (GV = 10%) e o GVI (controle negativo, solução de NaCl 0,9%).

No experimento *in vivo* com EBHA-Janaúba, a administração foi realizada por via intra peritoneal (i.p.), dose única. de 0,2 µL/p.v. (peso vivo) do animal, seguindo-se o protocolo de distribuição dos grupos (G) pela média do p.v. e concentração do EBHA-Janaúba, como: GI=24,16±2,7g variação (21-28g); GII=25,66±3,5g (21-30g); GIII=22,5±4,13g (16-27g); GIV=27,0±4,93g (23-36g); GV=24,83±1,83g (22-26g) e o GVI (0,9%, NaCl)=28,0±,0 (27-29g).

Os animais foram inoculados com uma solução de colchicina (1%) (droga antiinflamatória), i.p. na dose de 0,1µL/10g de p.v., 22 horas após terem recebido o EBHA-Janauba. Após 24 horas os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, em seguida, os fêmures foram extirpados, dissecados e cortados à altura das epífises proximais, seguindo-se as técnicas preconizadas por Ribeiro, (2003), posteriormente foram confeccionadas duas lâminas por fêmures de cada grupo onde se realizou a leitura e análise em microscópio binocular Zeis®, (1000x). Para a varredura do campo laminar foi utilizado a metodologia em “zigue-zague” sugerida por Franca; Brown) sendo analisadas 250 células por lâmina, totalizando 1.000 células, para todos os grupos estudados.

O grau de toxidez foi avaliado através dos valores dos índices mitóticos empregando-se a fórmula $IM (\%) = \frac{\text{numero de células metafásicas} \times 100}{\text{Total de células}}$ (SIEGEL; SHADDUCK, 1990).

Após coleta da medula foi realizado a necropsia completa. Amostras de órgãos vitais (pulmão, fígado, coração, rins e baço) foram coletadas e fixadas em formaldeído 10% (v/v) preparado em PBS 0,01M; pH 7,2. Os fragmentos submetidos à clivagem, sendo em seguida processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo a 3-4 micrômetros e corados com Hematoxilina-Eosina (H.E.) realizados no Laboratório de Anatomia Patológica (UEMA) seguindo-se os métodos de Carlton; McGavin, (1998) e Luna, (1968). A análise histopatológica foi realizada para verificação de alterações nos órgãos, após 24h da

administração do EBHA-Janaúba.

Os procedimentos de eutanásia dos animais obedeceram aos Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) (UEMA), conforme o Protocolo nº 21/2010.

Os resultados foram analisados através da Análise de Variância e as médias comparadas pelos testes de Student e Tuckey-Kramer, com nível de significância de 5%, pelo Software GraphdPad, Instat, v 3 (1993).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fitoquímica

O resíduo seco e rendimento do EBHA-Janaúba foi de 231,87 g (massa) e 7,03%, respectivamente, na concentração de 0,56g/mL. A triagem fitoquímica do EBHA-Janaúba foi observada a presença de taninos, alcalóides, saponinas, triterpenóides e cumarinas. Esses grupamentos químicos apresentam ação bioativa no metabolismo animal, principalmente os alcalóides que é um composto conhecido pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos (PERES, 2008).

3.2 Teste de Metáfase

Nos resultados observados constatou-se a presença de anomalias estruturais (AE) e totais (AT) encontradas nas células cromossômicas, consideradas como aberrações cromossômicas (AC) e classificadas como: cromossomos com falhas pequenas (GAPs), quebra de cromatina (Qcmt), cromossomos pulverizados (CP), cromossomos muito danificados (MD), fragmentos dicêntricos (FAP), fragmentos acêntricos simples (FAS).

Resultados das AT foram de 1956 células com AE, dentre as quais, os animais do GI que apresentou o IM (%) de 82,25%, o GII (17,58%) e o GIII (0,15%), enquanto os demais grupos, não foram observados AE (Tabela 1).

Os IM (%) das AC em ordem crescente foram de 29,08; 19,51 e 17,40% para GAPs, CP e Qcmt, respectivamente, para o GI (100%) e de 47,83; 25,28 e 11,04% (GII – 75%) (Tabela 1).

Os camundongos apresentaram somente AC do tipo GAP, para os animais do GI (100%) e GII (75%) que foram submetidos à ação do EBHA-Janaúba, respectivamente. As AC do tipo CP e Qcmt para animais do GI (100%) e GII (75%) foram inversamente, quando comparado com animais do

GIII (50%), que apresentaram maior percentual de AE. As AC do tipo MD apresentaram um discreto IM(%) no GII (75%) (Tabela 1) (Figura 1; 2; 3).

Nas AC do tipo FAP e FAS nas células da medula dos animais do GI (100%) quando comparado ao GII (75%) observou-se AE. no entanto, os animais dos GIII (50%), GIV (25%) e GV (10%), as células da medula óssea não apresentaram AC, o mesmo evento também ocorreu nos animais do GVI (controle) (Tabela 1). Na figura 1 observa-se que os animais do GI (100%) apresentaram elevada variação em todos os tipos de AC quando comparados aos demais grupos de animais e em algum momento os animais do GII (75%) também apresentaram discreta variação.

As AC comumente induzidas por agentes clastogênicos (indutores de quebras no DNA) são identificadas como fragmentos acêntricos ou dicêntricos ou produtos de translocações não-recíprocas. Estes tipos de aberrações são denominados instáveis. Inversões, duplicações e translocações são consideradas AC estáveis (GRANT, 1982). A presença de quebras cromossômicas deve ser considerada como um sinal de alerta para a ocorrência de danos herdáveis no material genético (NICHOLS, 1973), embora algumas quebras possam ser reparadas ou podem levar a célula à morte e não causar mutações herdáveis (GRANT, 1982).

O tipo de AC induzida está relacionado ao tempo no qual o núcleo interfásico foi exposto ao agente indutor de dano. Exposições que ocorrem durante a fase G₁ do ciclo mitótico resultam em danos em cromossomos inteiros, enquanto tratamentos durante as fases S e G₂ resultam em danos nas cromátides individuais. Após exposição durante a fase S, as AC mais encontradas são as quebras cromatídicas e as trocas entre 38 cromátides. Exposições durante a fase G₂ originam, principalmente, quebras cromatídicas e gaps cromatídicos (GRANT, 1978).

A possibilidade de alimentos possuírem efeitos adversos tem sido negligenciada e até mesmo ignorada (STOPPER, et al., 2005). Estudos na literatura indicam que diferentes produtos de origem natural como alguns flavonóides, alcalóides, terpenos e esteróis, amplamente utilizados nos últimos tempos, podem ser potencialmente genotóxicos, cancerígenos ou

teratogênicos desses compostos relacionadas a efeitos psicoanalépticos que desencadeiam crises epileptiformes e tetaniformes, transtornos psíquicos e sensoriais (SCHMITTA et al., 2003).

O mentol pode induzir a espasmo de glote e asfixia reflexa; a essência de Sabina, hemorragias uterinas, e a essência de enebro está relacionada a hematúrias (BRUNETON, 1991). Os mecanismos envolvidos que explicam a clastogenicidade e/ou interação com o DNA não estão totalmente elucidados. Segundo Schmitta e colaboradores, 2003, a segurança ou toxicidade da utilização destes produtos de origem natural dependem do tempo de exposição da dose utilizada.

Os resultados apresentados na tabela 1 quando comparados com os resultados do grupo controle são importantes no que diz respeito à indicação do possível efeito mutagênico do EBHA-Janaúba, considerando o GI e GII, sendo mais acentuado no GI, provavelmente indica o potencial lesivo às células da medula. Entretanto, deve-se considerar a dosagem a ser administrada ao animal.

As AC dos tipos GAPs, MD, FAP e FAS nos animais do GI (100%) apresentaram médias com diferença estatística significativa, quando comparada aos GII (75%) ($P < 0,0001$), assim como para as células medulares dos tipos Qcmt e CP ($P < 0,001$ e $P < 0,05$), respectivamente. Os cromossomos dos tipos GAPs e CP tanto para os animais do GI (100%) como para o GII (75%), ambos foram superiores quando comparados as demais AC (Tabela 2).

Dentre as AC em células medulares dos tipos Qcmt, MD, FAP e FAS nos animais do GII (75%) foram bem inferiores àquelas encontradas nos animais do GI (100%) sob a ação do EBHA-Janaúba. Nesse caso, observou-se que os animais do GII (75%) não apresentaram muitos danos estruturais nas células medulares, entretanto, o uso desse fitoterápico deve ser utilizado com medidas de segurança, na quantidade da dosificação por via oral (v.o.), em animais. Apesar de se observar que as AE foram de baixas no IM (%) no qual reproduz uma ação negativa aos animais, mesmo assim o fitoterápico deve ser administrado com segurança (Tabela 2).

Tabela 1 – Anomalias Estruturais e Índice Mitótico (%) das aberrações cromossômicas da medula óssea em camundongos machos (*Mus musculus*) tratados com EBHA de *Himatanthus drasticus*, nas concentrações de 100; 75; 50; 25; 10% e controle negativo.

Aberrações Cromossômicas	Grupos/IM(%)					GVI*	Total
	GI	GII	GIII	GIV	GV		
GAP	29,08	47,83	0	0	0	0	631
QcmT	17,4	11,04	33,33	0	0	0	319
CP	19,51	25,58	66,66	0	0	0	404
MD	13,85	1,62	0	0	0	0	227
FAP	13,05	9,88	0	0	0	0	244
FAS	7,08	1,05	0	0	0	0	131
TOTAL	82,25	17,58	0,15	0	0	0	1956

GAPs=cromossomos com falhas pequenas; QcmT=quebra de cromatina; CP=cromossomos pulverizados; MD=cromossomos muito danificados; FAP=fragmentos dicêntricos; FAS=fragmentos acêntricos simples; *GVI= animais com células medulares normais; G=grupos; IM=índice mitótico.

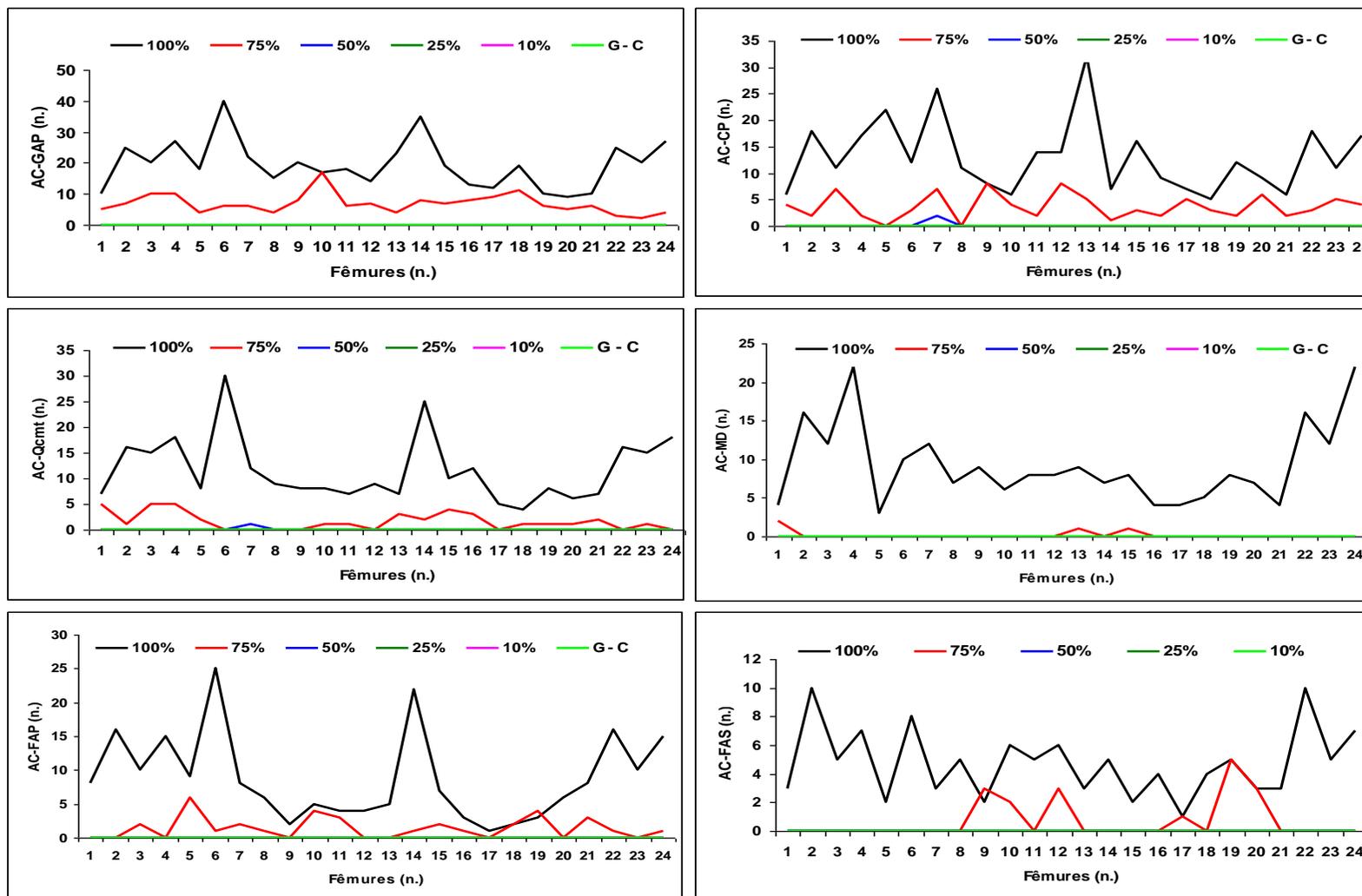


Figura 1 – Demonstrativo das Aberrações Cromossômicas: GAP, CP, Qcmt, MD, FAP e FAS encontradas em células de medula óssea de camundongos machos (*Mus musculus*) tratados com EBHA de *Himatanthus drasticus*.

Tabela 2 - Avaliação média das aberrações cromossômicas da medula óssea de camundongos machos (*Mus musculus*) tratados com EBHA de *Himatanthus drasticus*, nas concentrações de 100; 75; 50; 25; 10% e controle negativo.

ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS							
Grupos/ Concentrações g/mL (%)	Animais (%)	GAP*	Qcmt**	CP**	MD*	FAP*	FAS*
		M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
GI – 100	6	19,5 ± 7,78a	11,66 ± 6,41a	13,08 ± 6,78a	9,29 ± 5,27a	8,75 ± 6,38a	4,75 ± 2,4a
GII – 75	6	6,79 ± 3,16b	1,58 ± 1,71bc	3,66 ± 2,31bc	0,16 ± 0,48b	1,41 ± 1,61b	0,70 ± 1,39b
GIII – 50	6	0	0,043 ± 0,20bd	0,08 ± 0,41bd	0	0	0
GIV – 25	6	0	0	0	0	0	0
GV – 10	6	0	0	0	0	0	0
GVI – (C+)	3	0	0	0	0	0	0
			<0,001	<0,001	<0,0001	<0,0007	<0,0001
VI. P	-	<0,0001	<0,001	<0,05	<0,0001	<0,0002	<0,0001
			>0,05	<0,0001			
VI. T	-	7,41	-	-	8,42	5,46	7,15

Letras minúsculas iguais na coluna não apresenta diferença estatística ($P < 0,05$), ANOVA pelos de *Teste T (Student) e ** Teste Tuckey-Kramer

GAPs=cromossomos com falhas pequenas; QcmT=quebra de cromatina; CP=cromossomos pulverizados; MD=cromossomos muito danificados; FAP=fragmentos dicêntricos; FAS=fragmentos acêntricos simples; *GVI= animais com células medulares normais; G=grupos; IM=índice mitótico

As seções de fígado e baço do grupo controle negativo não revelaram alterações histopatológicas. Os hepatócitos conservaram a sua estrutura típica. O mesmo evento foi verificado nos grupos tratados por EBHA-Janaúba, considerando-se as diversas concentrações dosificadas nos animais. Os tecidos apresentaram aspecto histológico normal tanto no fígado, quanto no baço, mostrando uma cápsula hepática lisa e delgada, veia centrolobular e hepatócitos normais. O baço, folículos de tamanho uniformes, com cápsula lisa e delgada.

As seções do pulmão do grupo controle negativo; assim como os demais grupos tratados com EBHA-Janaúba nas diferentes concentrações não foram evidenciada nenhuma alteração histológica das células do parenquima pulmonar. Os brônquios apresentaram o epitélio simples e células caliciformes, avéolos pulmonares com epitélio cilíndrico simples, pleura sem alteração microscópica

As seções de rim dos camundongos do grupo controle negativo com NaCl 0,9%, não apresentaram alterações celulares morfológicas, destacando-se entre as várias zonas do rim foi nítida, sem hemorragias e nem alterações celulares, apresentando glomérulos com estruturas morfológicas normais. Quanto aos grupos tratados com EBHA-Janaúba também não foi verificado nenhuma alteração histológica que evidenciar-se toxidez. A zona cortical e medular sem alterações patológicas; tubos excretores e lóbulos com normalidade.

Na literatura encontram-se estudos com plantas medicinais com propriedades nefroprotetoras, via atividade antioxidante e/ou de remoção de radicais livres devido à concentração elevada de flavonóides e alcalóides que estas contêm (RICE-EVANS et al., 1997). Estudos de proteção mostraram que as plantas têm ingredientes ativos que são capazes de remover radicais livres nos sistemas vivos (MITRA et al., 1998 *apud* SILVA, 2009). Pode-se inferir que a Janaúba possui uma ação protetora devido à presença na sua constituição fitoquímica de vários compostos fenólicos, como os flavonóides que são antioxidantes naturais. O flavonóide quercetina tem mostrado ser o mais ativo,

uma vez que apresenta todas as características estruturais para sua atividade antioxidante (PIETTA, 2000).

As seções do coração dos camundongos do grupo controle negativo com NaCl 0,9%, somados aos tratados com EBHA-Janaúba nas diversas concentrações não apresentaram alterações celulares morfológicas. O corte transversal demonstra que o endocárdio apresentou características próprias de células endoteliais de revestimentos normais, o mesmo ocorreu com o miocárdio com características próprias de tecido muscular estriado cardíaco.

3 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que EBHA-Janaúba apresenta discreta ação em células medulares, porém não foi evidenciada nenhuma alteração histológica de células teciduais dos órgãos avaliados, indicativo de baixa toxicidade, considerando-se assim inócuo ao uso do fitoterápico de forma moderada, com segurança.

REFERÊNCIAS

BRAZ FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas - a peregrinação de Pacatupano. **Química Nova**, n. 17, p. 5, 1994.

CARANO, A.V.; NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**, Amsterdam, n. 204, p. 379-406, 1988.

CARLTON, W.W.; MCGALVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thompson**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda, 1998.

CHEN Q.; WU, L.J.; WANG, J.; LI, H. Chemical studies on the constituents of *Lophatherum gracile* Brongn. **J Shenyang Pharm Univ.**, v. 4, n. 19, p. 23, 2002.

FRANÇA, O.O.; BROWN, R.T.; SANTOS, C.A.M. Uleine and emethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 208-210, 2000.

FREITAS, A.F.; MILAGRES, J.C.; TEIXEIRA, N.M. Produção de leite em rebanho leiteiro mestiço. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 20, p. 80-89, 1991.

LUNA, L.G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathologic**. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: UFC, 1998.

MATOS, F. J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 1997.

MATTER, B.E.; TSUCHIMOTO, T. Mutagenicity test system for the detection of chromosome aberration *in vivo*. **Archives of Toxicogy**, Berlin, v. 46, p. 89-98, 1980.

MELO, Anaxímenes José Marques de et al. Avaliação dos efeitos mutagênicos e citotóxico da maniçoba (*Manihot glaziovii* Muell Arg), através do teste de micronúcleos em medula óssea de roedores *in vivo*. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 24, 2009. Disponível em: <http://eduep.uepb.edu.br/biofar/n3v1/03-avaliacao_dos_efeitos_mutagenicos.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2011.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário**. 2008. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/lazaropp>>. Acesso em: 11 jun. 2011.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, n. 63, p. 1035-1042, 2000.

RIBEIRO, L. R. Teste de micronúcleos em medula óssea de roedores *in vivo*. In.: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 356.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, n. 2, p. 152-159, 1997.

RODRIGUES, M.A.M.; CAMARGO, J.L.V. Carcinogênese. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

SCHALL, V.T. et al. Evaluation of temporal, seasonal and geographic stability of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens* latex. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 183-191, 1992.

SCHALL, V.T. et al. Evaluation of genotoxic activity and acute toxicity of *Euphorbia splendens* latex, a molluscicide for the control schistosomiasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, n. 24, p. 573-582, 1991.

SIEGEL, J.P.; SHADDUCK, J.A. Mammalian safety of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In: DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, D.J. **Bacterial control of mosquitoes and blackflies**. New Jersey: Rutgers University, 1990. cap. 12.

SILVA, Vera Armanda Moreira da. **Ação de extractos de *Pterospartum tridentatum* em ratinhos expostos a CCL**. 2009. 67f. Dissertação (Mestre em Biologia Molecular e Celular) - Universidade de Aveiro, [S. l.], 2009. Disponível em: <<http://ria.ua.pt/bitstream/10773/897/1/2010000747.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2011.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 3. ed. Santa Catarina: UFSC, 2001.

VASCONCELLOS, M.C.; SCHALL, V.T. Latex of coroa-de-cristo (*Euphorbia splendens*): an effective molluscicide. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 475-476, 1986.

ZHANG, M.W.; GOA, B.J.; PENG, Z.M. Genetic effects on Fe, Zn, Mn and P contents in indica black pericarp rice and their genetic correlations with grain characteristics. **Euphytica**, n. 135, p. 315-323, 2004.

CAPÍTULO 4

1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De forma indiscriminada, a população faz uso de várias plantas no tratamento de muitas doenças podendo se tornar até mesmo um sério problema de saúde pública. Muitas substâncias químicas são encontradas nas plantas, sendo necessário então que testes fitoquímicos sejam realizados para que se conheça quais os metabólitos secundários presentes e desta forma poder usá-las de uma forma mais segura, obtendo-se assim bons resultados.

A utilização cada vez mais acentuada de produtos como fármacos, agroquímicos, cosméticos, corantes e muitos outros, tem levado ao aumento nas taxas de mutagênese.

Os metabólitos secundários contidos nas plantas medicinais podem ter ação mutagênica e toxicológica em animais. Testes citogenéticos devem ser realizados para a avaliação de agentes genotóxicos contidas nas plantas medicinais que agem nas células dos mamíferos.

Faz-se necessário conhecer a composição química dos alimentos, sua ação no organismo, seu valor alimentício e calórico, suas propriedades físicas, químicas, toxicológicas, etc. para que se possa oferecer aos animais e assim, assegurar boa produtividade a um custo/benefício compatível com a realidade da produção nos diferentes momentos do ano.

A gordura fornece energia para todas as atividades metabólicas dos organismos que a consomem, constituindo a fração mais energética dos alimentos. Por ter apresentado o teor de gordura baixo no estudo bromatológico, o vegetal não deve ser a única fonte de alimentação animal.

A presença de várias substâncias de metabólitos secundários nos resultados do estudo fitoquímica do vegetal *Himatanthus drasticus* caracteriza o extrato com potencial farmacológico.

O estudo da mutagenicidade de *H. drasticus* apresentou discreta ação em células de medulas sem toxidez e sem nenhuma alteração na histologia das células teciduais nos órgãos estudados. Desta forma, pode-se considerar segura a utilização da janaúba como fitoterápico.

REFERÊNCIAS

ABDEL-KADER, M.S. et al. Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname rainforest. **Journal of Natural Products**, Downers Grove, v. 60, n. 12, p. 1294-1297, 1997.

ADLER, I.D. Cytogenetics tests in mammals. In.: VENITT, S.; PARRY, J. M. **Mutagenicity testing**: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1984, p. 275-305.

AFONSO-CARDOSO, S.R. et al. *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **Korean Journal of Parasitology**, Seul, v. 45, n. 4, p. 255-266, dez. 2007.

ALBERS-SCHÖNBERG, G.; SCHMID, H. Plumericin, isoplumericin, -dihydroplumericin and -dihydroplumericinic acid. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 44, n. 181, p. 1447-1473, 1961.

ALBERTS, B. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 16, p. 678-689, dez. 2006.

ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. New York: J. Willey, 1960.

ALVES, R.R.N. et al. Utilização e comércio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 4, n. 26, dez. 2007.

AMARO, N.B.; D'ALESSANDRO, W.B.; CASTRO JÚNIOR, L.C. Estudo da atividade larvicida de *Trichilia swartz* (Meliaceae) para o controle de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 21, 2006, Recife. **Anais...** Recife, 2006. CD-ROM.

AMOROZO, M.C.M.A.A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais**: arte e ciência. São Paulo: UNESP, 1996. p. 57-63.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG II). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Bot. J. Linn. Society**, London, v. 141, p. 399-436, 2003. Disponível em: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x/full>>. Acesso em: 21 jul. 2011.

ÂNGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANVISA. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, DF, 2004. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word>>. Acesso em: 21 jun. 2011.

AOAC. **Official methods of analysis**. Washington: [s. n.], 1975.

BAGGIO, C.H et al. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Planta Med.**, v. 71, n. 8, p. 733-738, 2005.

BARRETO, A.S. et al. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. **J Braz Chem Soc.**, n. 9, p. 430-434, 1998.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas no Brasil**. Viçosa: UFV Imprensa Universitária, 1991, v. 3.

BERRIN, Y. et al. Multi-organ toxicity following ingestion of mixed herbal preparations: an unusual but dangerous adverse effect of phytotherapy. **Eur J Intern Med.**, v. 17, n. 2, p. 130-132, 2006.

BEZERRA, Denise Aline Casimiro et al. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. Patos, PB: CSTR; UFCG, 2008.

BICUDO, H.E.M.C. **Base molecular da mutação**. cap. 30. São Paulo: Manole, 1987.

BITTNER, M. et al. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae em Chile. **Bol. Soc. Chil. Quim.**, Concepción, v. 46, n. 4, p. 1-15, dez. 2001.

BRUNETON, J. Phenols and Phenolic acids. In.: BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry and medical plants**. EUA: Lavoisier Press, 1995, p. 211-227.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991.

BRUSICK, D.J. Structure-activity relationships in mutation and cancer. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 305, p. 101-115, 1994.

BURNS, G.W; BOTTINO, P.J. **Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

CARANO, A.V.; NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**, Amsterdam, n. 204, p. 379-406, 1988.

CARNEIRO, J.E.S. et al. Alterações nos caracteres de plantas M1 de *Phaseolus vulgaris* derivadas de sementes tratadas com etil-metanossulfonato. **Revista Ceres**, v. 34, n. 193, p. 313-320, 1987.

CARVALHO, M.G et al. New biflavonoid and other constituents isolated from *Luxemburgia nobilis*. **J Bras Chem Soc.**, n. 13, p. 119-123, 2002.

CASTILLO, D. et al. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus succuba* (Apocynaceae). **J Ethnopharmacol**, n. 112, p. 410- 414, 2007.

CECHINEL FILHO, Yunes; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificações estrutural para a otimização da atividade. **Quim. Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CHAN, T.Y. et al. A multidisciplinary approach to the toxicologic problems associated with the use of herbal medicines. **Ther Drug Monit.**, v. 27, n. 1, p. 53-57, 2005.

CHEN, Tsing-Chang et al. Suppressing impacts of the Amazonian deforestation by global circulation change. **Bull. Amer. Meteor. Soc.**, n. 82, p. 2209-2216, 2001.

COLARES, A.V. et al. Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). **Phcog. Mag.**, v. 4, n. 14, p. 73-77, 2008a.

COLARES, A.V. et al. Efeito gastroprotetor do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). **Infarma**, v. 20, n. 11/12, p. 34-36, 2008b.

COLOMBO. **Utilizando adequadamente as plantas medicinais**. Colombo: Herbarium, 2008.

CONRAD, H.R. et al. Estimating net energy lactation from components of cell solubles and cell walls. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 2, p. 427-436, 1984.

CORDELL, G.A.; QUINN-BEATIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytother Res.**, n. 15, p. 183-205, 2001.

CORDELL, G.A. **Introduction to alkaloids: a biogenetic approach**. New York: John Wiley e Sons, 1981.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v. 6. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2. ed. Bronx: New York Botanical, 1988.

CUNHA, O. **Ementa da cultura brasileira**. Rio de Janeiro: [s.n.], 1989.

C. NETO, C. et al. Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 79, p. 133-138, 2002.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996.

DRAKE, J.W. Mechanisms of mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Washington, v. 14, p. 11-15, 1989.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. São Paulo: Manole, 2001.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Cienc. Cult.**, Campinas, SP, v. 55, n. 3, p. 35-36, jul./set. 2003.

ENDO, Y. et al. Confluent acid and 2'-O-methylperlatolic acid, monoamine oxidase B inhibitors in a brazilian plant, *Himatanthus sucuuba*. **Chem Pharm Bull**, n. 42, p. 1198-1201, 1994.

EVANS, H.J. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberations in mutagen test. In: KILBEY, B. J.; LEGATOR, W. M. **Handbook of mutagenicity test procedures**. Amsterdam: Elsevier, 1984, p. 405-428.

EVANS, W.C. **Trease and Evans' pharmacognosy**. 15. ed. Londres: Saunders, 2002.

EWING, Galen W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1982. v. 2.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method: special issue of mutation research on the In vitro microcleus test. **Mutation Research.**, v. 392, p. 11-18, 1997.

FONTE, N.N. **A complexidade das plantas medicinais**: algumas questões de sua produção e comercialização. 2004. 183f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FRANÇA, I.S.X. et al. Medicina Popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev. Bras. Enferm.**, Brasília, DF, n. 61, v. 2, p. 201-208, 2008.

GARDNER, E.J.; SNUSTAD, D.P. **Genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.

GRUMBACH, A.; SCHMID, H.; BENEZE, W. An antibiotic from plumeria acutifolia. **Experientia**, Basel, v. 8, p. 224-225, 1952.

GUTERIDGE, J.M.C. Ageing and free radicals. **Medical Laboratory Sciences**, London, v. 49, p. 313-318, 1992.

HARMAN, D. Free radical theory of ageing. **Mutations Research**, Amsterdam, p. 275-266, 1992.

HEDLEY, D.W. et al. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 31, p. 1333, 1983.

HENRIQUES, A.T. et al. B-D-Glucopyranosylvincosamide, a light regulated índole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 449-454, 2004.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 4. ed. Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade, 2002. p. 651-666.

HENRIQUES, J.A.P.; QUEROL, C.B. Base molecular da mutação. In: COSTA, S.O.P. **Genética molecular e de microorganismos**: fundamentos engenharia genética. São Paulo: Manole, cap. 8, p. 117-136, 1987.

JIMENEZ, J.A. et al. Contribution to the flora of Morocco: terricolous and saxicolous bryophytes of Jbel Bouhalla. **Journal of Bryology**, v. 24, p. 243-250, 2002.

JOLY, A.B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JOLY, A.B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Imprensa Nacional, 1998.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

KEMPTON, T.J.; LENG, R.A. Protein nutrition of growing lambs. 1. responses in growth and rumen function to supplementation of a lowprotein cellulosic diet with either urea, casein and formaldehyde-treated casein. **British Journal of Nutrition**, v. 42, p. 289-302, 1979.

KING, C.M.; GILLESPIE, E.S.; MCKENNA, P.G. An investigation of mutations as a function of age in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 316, p. 79-90, 1994.

KUBLINSKI, C. **Farmacognosia**: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega, 2000.

LAVEZZO, W. Ensilagem de capim elefante. In.: SIMPOSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 10, 1994, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1988, p. 169-275.

LEXIS, L. A.; FASSET, R.G.; COOMBES, J.S. α -tocopherol and α -lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in a cyclosporine A-treated rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 98, p. 68-73, 2006.

LIMA, C.P. **Genética humana**. 3. ed. São Paulo: Harbra, 1996.

LIMA, V.B.L.; BRAGA, R.M.; KOCH, I. **Estudo fitoquímico de *Himatanthus bovatus***. 2003. Disponível em: <<http://www.sbq.org.br/ranteriores/23/resumos/0424>>. Acesso em: 10 jun. 2011.

LITTLE, J.E.; JOHNSTONE, D.B. Plumericin: an antimicrobial agent from *Plumeria multiflora*. **Archives of Biochemistry**, New York, v. 30, n. 2, p. 445-452, 1951.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

MACHADO, Aline Alvares. **Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae)**. 2008. 78f. Monografia (Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MARIZ, S.R. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 3, p. 372-378, 2006.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised method for salmonella mutagenicity test. **Mutat Res**, n. 113, p. 175-215, 1983.

MARTIN, G.S. **Ethnobotany: a method**. New York: Chapman e Hall, 1995.

MARTINS, T.R. **Bromatologia e fundamentos da nutrição**. Universidade do Oeste Paulista, 2007.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: UFC, 1998.

MATOS, F.J.A. **Plantas da medicina popular do nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas**. Fortaleza: EUFC, 1999.

MATTER, B.E.; TSUCHIMOTO, T. Mutagenicity test system for the detection of chromosome aberration *in vivo*. **Archives of toxicology**, Berlin, v. 46, p. 89-98, 1980.

MELLO, R; NÖRNBERG, J. L. Fracionamento dos carboidratos e proteínas de silagens de milho, sorgo e girassol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1537-1542, set./out., 2004.

MELO, M.E.B.; FERREIRA, L.C.S. **Avaliação do potencial genotóxico de fármacos com ação antiparasitária através de testes de mutagenicidade em bactérias e clastogenicidade em células de mamíferos.** 1996. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 1996.

MERTENS, D.R. Using neutral detergent fiber to formulate dairy rations and estimate the net energy content of feeds. In.: CORNELL NUTRITION CONFERENCE, 1983, Cornell. **Anais...** Cornell, 1983. p. 60-68.

MESQUITA, C.T.; XAVIER, S.S.; MESQUITA, E.T. Insuficiência cardíaca aguda. In: CELMO, Celeno Porto (Org.). **Doenças do coração: tratamento e prevenção.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 281-284.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de fitoterápicos.** Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004.

MILFORD, R.; MINSON, D.J. Intake of tropical pasture species. In.: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESSO, 9. São Paulo, 1966. **Anais...** São Paulo: International Grassland Congress, 1966. p. 81-822.

MILLONIG, G.; STADLMANN, S.; VOGEL, W. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a Noni preparation (*Morinda citrifolia*). **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, v. 17, n. 4, p. 445-447, 2005.

MIRANDA, G.J.; AZZAM, O.; SHIRAKO, Y. Comparison of nucleotide sequences between Northern and Southern Philippine isolates of rice grassy stunt virus indicates occurrence of natural genetic reassortment. **Virology**, v. 266, p. 26-32. 2000.

MODESTO, M.M.L.S. **Aspectos ecológicos e sócio-econômicos de *Himatanthus articulata* (Wahl.) Woodson:** "janaguba" da Chapada do Araripe. 1997. 55f. Monografia (Especialização em Botânica) - Universidade Regional do Cariri, Crato, 1997.

MONTANARI JUNIOR, I. Exploração econômica de plantas medicinais da Mata Atlântica. In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (Orgs.). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais.** São Paulo: SENAC, 2002.

MORAND-FEHR, P.; SAUVANT, D. Composition and yield of goat milk as affected by nutritional manipulation. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p.1671-1680, 1980.

NASCIMENTO, M.P.S.C.B. et al. **Forrageiras da bacia do Parnaíba: usos e composição química**. Teresina: EMBRAPA-CPAMN; Recife: Associação Plantas do Nordeste, 1996. (EMBRAPACPAMN Documento; 19).

NÓBREGA, F.G. O perigo das mutações no RNA. **Ciência Hoje**, Ribeirão Preto, SP, v. 24, n. 142, p. 22-23, 1998.

NOVAES, J.R.C.; RAPOPORTE, B. **Espécies coletadas no Estado do Rio de Janeiro depositadas no Herbário RB**. Rio de Janeiro: [s. n], 1996.

NRC. National Research Council. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001.

NUNES, J.F. **Produção de caprinos leiteiros: recomendações técnicas**. Maceió: EPEAL; CODEVASF, 1985.

OLIVEIRA, R.B. **Terpenos e terpenóides**. 2007. Disponível em: <[www.geocities.com.br/plantas tóxicas](http://www.geocities.com.br/plantas_toxicas)>. Acesso em: 15 ago. 2011.

OLIVEIRA, R.B. de et al. Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, n. 2, 2005. Disponível em: <http://www.farmacia.ufg.br/revista/_pdf/vol2_2_supl/resumos/ref_v2_2_supl-2005_p137-139%20Oliveira2.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2011.

OMS. **Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales**. Genebra: OMS, 2003a.

OMS. Organização mundial da Saúde. **Guidelines on good agricultural and collection practices**. Geneva: [s. n.], 2003b.

OZAKL, K. et al. A critical role for IL-221 in regulating immunoglobulin production. **Science**, n. 298, p. 1630-1634, 2002.

PELLETIER, B. Localisation du nickel dans les minéraux "garnieritiques" de Nouvelle-Calédonie. **Sciences Géologiques Memoire**, Strasbourg, v. 73, p. 173-183, 1983.

PERDUE, G.P.; BLOMSTER, R.N. South american plants III: isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocinaceae). **J. Pharm. Sci.**, v. 67, n. 9, p. 1322-1323, 1978.

PEREIRA, A.S.; AQUINO NETO, F.R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Quím. Nova**, v. 23, n. 3, p. 370-379, 2000.

PEREIRA, Marcos Neves. **O básico em nutrição de gado de leite**. 2005. Disponível em: <<http://www.revistacoopercitrus.com.br/?pag=materia&codigo=5379>>. Acesso em: 19 set. 2011.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário**. 2008. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp>>. Acesso em: 11 jun. 2011.

PERES, T.P. Palestra: noções básicas de cromatografia. **Centro de Pesquisas e Desenvolvimento de Proteção Ambiental Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227- 229, jul./dez. 2002.

PIERCE, B.A. **Genética**: um enfoque conceitual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PLUMEL, M.M. Le genre *Himatanthus* (Apocinaceae). Revisión taxonomique: bradea. **Boletim do Herbarium Bradeanu**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 1-20, 1991.

PREMARATNA, A.; SHADAKSHARASWAMY, M.; NANJAPPA, S. Isolation, purification and properties of a lectin from the latex of *Synadenium grantii* Hook f. **Indian Journal of Biochemistry e Biophysicis**, New Delhi, v. 18, n. 2, p. 32-35, 1981.

PRESTON, R.J.; DEAN, B.J.; GALLOWAY, S. Mammalian in vivo cytogenetics assays; Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 189, p. 157-165, 1987.

PRIMACK, R.B. **Essentials of conservation biology**. Massachusetts: Sunderland, 1993.

QUEIROZ, M.S. O paradigma meconista da medicina ocidental moderna: uma perspectiva ontropológica. **Revista de Saúde Pública.**, n. 20, p. 309-17, 1986.

RANGASWAMI, S.; RAO, E.V.; SURYANARAYANA, M. Chemical examination of *Plumeria acutifolia*. **Indian Journal of Pharmacy**, Bombay, v. 23, p. 122-124, 1961.

RATTMANN, Y.D. et al. Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. **J Ethnopharmacol**, n. 100, p. 268-275. 2005.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REID, R.L.; KLOPFENSTEIN, T.J. **Forages and crop residues**: quality evaluation and systems of utilization. **J Anim Sci.**, n. 57, p. 534-562, 1983.

RESENDE, F.D.; QUEIROZ, A.C.; FONTES, A.A. Fibra em detergente neutro versus fibra em detergente ácido na formulação de dietas para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 24, n. 3, p. 342-350, 1995.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

RIZZINI, T.C.; MORS, W.B. **Botânica econômica brasileira**. 3. ed. São Paulo: Âmbito Cultural, 1995.

ROGÉRIO, A.P. Anti-asthmatic potential of a D-galactose binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology Advance Access**. 2007. Disponível em: <<http://glycob.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/cwm053v1>>. Acesso em: 29 maio. 2011.

ROGERO, S.O.; LUGAO, A.B.; IKEDA, T.I. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SANTOS, M.H. et al. Um espalhador de baixo custo de fase estacionária em placas para cromatografia em camada delgada. **Quím. Nova**, v. 30, n. 7, p. 1747-1749, 2007.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS, 2002. p. 333-365.

SAVAGE, J.R.K.A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. **Mutation Research, Amsterdam**. v. 207, p.33-36, 1988.

SCHMID, H.; BENEZE, H. The constitution of fulvoplumierin. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 36, p. 205-214, 1953.

SCHMIDT, W. The micronucleus test. **Mutation Research.**, n. 31, p. 9-15, 1975.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides Indólicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. p. 1102.

SHARMA, P. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plants extracts with antiplasmodial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, p. 239-43, 2001.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. de. **Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002.

SILVA, J.R.A. et al. Atividade citotóxica seletiva do látex de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. 15, 1998a, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, v. 1. p. 03117, 1998a.

SILVA, J.R.A. et al. Esteres triterpenicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**, n. 21, p. 702-704, 1998b.

SILVA, J.R.A. et al. Composição e atividades antiinflamatórias e analgésica do látex de *Hymatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson (Apocynaceae). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 5, 1998c, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: [s.n.], 1998c. p. 89.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRG, 2007.

SIMPSON, M.G. **Plant systematics**. Elsevier Academic Press: California, 2006.

SINGER, B.; GRUBER, D. **Molecular biology of mutagens and carcinogens**. New York: Plenum Press, 1983.

SOARES, Alexandra Martins dos Santos; MACHADO, Olga Lima Tavares. **Defesa de plantas**: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. 2007. Disponível em: <http://www.ccaa.ufma.br/revistatropica/Artigos_nr1/biologia/DefesaDePlantasSinalizacaoQuimicaEEspeciesReativasDeOxigenio_bio_Ar.pdf>. Acesso em: 14 set. 2011.

SOFIATI, Filipe Toni. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* H.B.K. (Polygonaceae) e *Synadenium carinatum* BOISS (Euphorbiaceae)**. 2009. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP, 2009.

SOUSA, F. et al. **CO₂ soil degassing mapping**: a contribution to the volcanic risk assessment at Furnas Village (S. Miguel Island, Azores). [S. l.]: General Assembly da EGU, 2004.

SOUZA-FAGUNDES, Elaine M. et al. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 8, p. 1207-1212, dez. 2002.

SOUZA, M.S. et al. Inhibition of nitric oxide and interferon- γ production by iridoids and triterpenes from the roots of *Himatanthus succuba*. **Pharmacogn Mag.**, n. 2, p. 216-219, 2006.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SPINA, A.P. **Estudos taxonômicos, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. Ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae)**. 2004. 197f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

STROBEL, Howard A. **Chemical instrumentation: A systematic approach**. 2. ed. Addison - Wesley Publishing company, 1973.

SUFFREDINI, I.B. et al. Antibacterial activity of Apocynaceae extracts and MIC of *Tabernaemontana angulata* stem organic extract. **Rev Bras Cienc Farm.**, v. 38, p. 89-94, 2002.

TAKEDA, I.J.M.; FARAGO, P.V. **Vegetação do parque estadual de Vila Velha: guia de campo**. v. 1. Curitiba: Serzegrat, 2001.

TARTUF, G.; MARTÍNEZ, J.R.; STASHENKO, E.E. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales em emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. **Revista Colombiana de Química**, Bogotá, v. 34, n. 1, 2005.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca-New York: Cornell University Press, 1994.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and it's applications to forages. **Journal of Animal Science.**, v. 26, n. 1, p. 119-129, 1967.

VARELLA, R.F. et al. Soil fluxes of CO₂, CO, NO, and N₂O from an old pasture and from native savanna in Brazil. **Ecological Applications.**, v. 14, n. 4, p. 221-231, 2004.

VASCONCELLOS, M.C.; SCHALL, V.T. Latex of coroa-de-cristo (*Euphorbia splendens*): an effective molluscicide. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 475-476, 1986.

VELOSO, M.P.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T.T. Dihidroplumericinic acid from *Himatanthus phagedaenicus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 669-671, 1999.

VIEGAS JR., C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VIJG, J., GOSEN, J.A. Somatic mutations and cellular aging. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 104B, n. 3, p. 429-437, 1993.

VILLEGAS, L.F. et al. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 193-200, 1997.

VILLA, L.L., BRENTANE, R.R. Base molecular da mutação. In: COSTA, S. O. P. **Genética molecular e de microorganismos**: fundamentos da engenharia genética. São Paulo: Manole, cap. 29, p. 417-480, 1987.

VOGEL, A.I. **Análise química quantitativa**: livros técnicos e científicos. Rio de Janeiro: Ed. S.A., 2002.

WATTENBERG, L.W. Chemoprevention of Cancer. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1-8, 1985.

WOOD, C.A. et al. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. **Chem Pharm Bull**, n. 49, p. 1477-1478, 2001.

YUNES, R.A. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapeco: Argos, 2001.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or fault tests? **Mutat Res.**, n. 492, p. 9-38, 2001.

ZHANG, A et al. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sci.**, v. 61, p. 383-394, 1997.

ANEXOS

ANEXO A - Teste de Metáfase em células de medula óssea de camundongos
(Hsu; Patton, 1969; Zambrano et al., 1982; Melo, 1996).

O teste de metáfase foi realizado em camundongos albinos Swiss, machos com 30 dias de vida. A distribuição dos animais foi realizada em grupos (G), considerando-se às concentrações do EBHA-Janaúba e peso dos animais.

Os camundongos foram inoculados com uma solução de colchicina (1%), via i.p. na dose de 0,1 ml/10g de peso corporal, 22 horas após terem recebido o extrato EBHA-Janaúba. Após 24 horas os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical.

Em seguida, os fêmures foram extirpados, dissecados e cortados a altura das epífises proximais. Com uma seringa e agulha, tipo tuberculina, foi injetada no canal medular dos fêmures dos camundongos 0,3 ml de uma solução isotônica de NaCl (0,9 %) deixando-se escorrer as células da medula óssea dentro de um tubo de centrífuga contendo 3,0 mL da solução de NaCl.

A suspensão de células foi homogeneizada várias vezes com uma pipeta de Pasteur fina e, em seguida, centrifugada a 1.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento homogeneizado em 4 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M). A suspensão foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 25 minutos para hipotenização e lise das células. A suspensão foi, em seguida, centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante descartado. Ao sedimento, adicionou-se o fixador (metanol: ácido acético 3:1), recém preparado, sendo as células ressuspensas até obter-se uma solução homogênea sem grumos.

O processo de fixação das células foi repetido duas vezes sendo diminuído os volumes dos fixadores para 3 ml nas duas últimas centrifugações. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células, novamente ressuspensas. Em lâminas previamente limpas e totalmente desengorduradas, mantidas submersas em água destilada gelada, foram pingados 2 a 3 gotas do material sobre uma película de água que se forma sobre as lâminas. Em seguida as lâminas foram secas em papel de filtro e, ligeiramente, flambadas em lamparina a álcool onde foram coradas pelo método de Giemsa e analisadas ao microscópio ótico convencional.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Escopo e política
- Forma e preparação de manuscritos
- Envio de manuscritos

Escopo e política

A **Revista Brasileira de Farmacognosia** é um periódico destinado à publicação de trabalhos científicos originais, artigos de revisão e divulgação no campo da Farmacognosia (estudo dos produtos naturais biologicamente ativos).

Artigos Originais (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho.

Artigos de Revisão (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica da Farmacognosia, contendo uma visão crítica, com o objetivo principal de beneficiar clientela formada por pós-graduandos e não-especialistas da área. Os Editores da RBFAR poderão, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão. É desejável que o autor tenha publicações na referida área.

Artigos de Divulgação (em português, inglês ou espanhol): apresentação de algum aspecto ou área da Farmacognosia, redigido de forma didática, com o objetivo de beneficiar clientela formada por estudantes de graduação, pós-graduação, não-especialistas na área, farmacêuticos e professores de áreas afins.

Forma e preparação de manuscritos

1. NORMAS GERAIS

1.1 Todos os manuscritos submetidos devem ser inéditos. A publicação simultânea de manuscritos descrevendo o mesmo trabalho em diferentes periódicos não é aceitável. Os direitos de publicação passam a ser da Revista Brasileira Farmacognosia, inclusive traduções; publicações subseqüentes são aceitas desde que citada a fonte.

1.2 A **Revista Brasileira Farmacognosia** recebe para publicação trabalhos científicos originais, revisões e comunicações. O conteúdo dos trabalhos é de total responsabilidade do(s) autor(es), e não reflete necessariamente a opinião do Editor, dos Editores de Seção ou dos membros do Conselho Editorial.

1.3 O idioma para a publicação é o inglês. Manuscritos escritos por autores cuja língua materna não é o inglês devem ser verificados por um serviço de edição profissional de língua inglesa antes da submissão. Auxílio de serviços de edição independente pode ser encontrado em <http://journalexperts.com?rcode=BJP>. Este trabalho é pago e de responsabilidade dos autores e o uso de um desses serviços de tradução não garante o aceite ou preferência para publicação.

1.4 A **Revista Brasileira de Farmacognosia** submeterá todos os manuscritos recebidos à análise de consultores ad hoc, cujos nomes permanecerão em sigilo e que emitirão pareceres para decidir sobre a pertinência de sua aceitação, podendo inclusive, reapresentá-los ao(s) autor(es) com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias e/ou para que os mesmos sejam adequados às normas editoriais da revista.

1.5 Toda idéia e conclusão apresentadas nos trabalhos publicados são de total

responsabilidade do(s) autor(es), e não reflete necessariamente a opinião do Editor, dos Editores de Seção ou dos membros do Conselho Editorial.

1.6 Todos os artigos envolvendo estudos com humanos ou animais deverão ter Pareceres dos Comitês de Ética de Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais das instituições a que pertencem os autores, autorizando tais estudos.

1.7 Todo material vegetal utilizado na pesquisa descrita no trabalho deve ter a indicação do seu local de coleta (inclusive coordenadas obtidas por GPS, se possível), o país de origem, o responsável pela identificação da espécie e a localização da exsicata. Os autores devem estar preparados para fornecer evidência documental de que a aprovação para a coleta foi concedida pela autoridade apropriada no país de origem.

1.8 Os seguintes critérios de rejeição têm aplicação imediata: i) o manuscrito não se enquadra nas áreas da Revista; ii) o manuscrito é muito preliminar, com apenas relato de atividade biológica sem a comparação com uma referência ou sem um controle positivo; iii) a origem botânica não está claramente identificada, autenticada e documentada; iv) trabalhos experimentais de atividade antimicrobiana e antioxidante com extrato bruto sem a identificação das substâncias ativas isoladas e identificadas.

2. NORMAS PARA A ELABORAÇÃO DAS CONTRIBUIÇÕES

2.1 Os **autores** devem manter uma cópia eletrônica do manuscrito submetido, para o caso de possível perda ou danos causados ao original enviado à revista.

2.2 As **Figuras** (fotografias, gráficos, desenhos etc.) deverão ser apresentadas no final no texto, após as Referências, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas abaixo das figuras. Suas respectivas posições no texto deverão ser indicadas, preferentemente, logo após sua citação no corpo do trabalho.

2.3 As **Tabelas e os Quadros** também devem ser apresentados após as Referências, numerados consecutivamente em algarismos arábicos. As tabelas (dados numéricos) não podem ser fechadas por linhas laterais. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas na parte superior dos mesmos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto, onde as tabelas e os quadros serão intercalados, preferentemente, logo após sua citação no corpo do trabalho.

2.4 As **legendas de ilustrações botânicas** devem ser de acordo com as normas adotadas pela revista. Solicitar as normas pelo endereço revista@sbfgnosia.org.br.

3. FORMATAÇÃO DO TEXTO E CONTEÚDO DO TRABALHO

3.1 Original papers. Trabalhos originais são artigos de pesquisa original descrevendo resultados experimentais. O manuscrito deve estar disposto na seguinte ordem: Título, Resumo, Unitermos, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências, Figuras com legendas, Tabelas, Fórmulas estruturais. Resultados e Discussão podem aparecer como duas partes distintas, ou como um combinado "Resultados e discussão". O tamanho normal do texto principal de um trabalho original, excluindo referências, tabelas, figuras e legendas de figuras, é de cerca de 3000 palavras. Em casos excepcionais e casos devidamente justificados, manuscritos podem ser aceitos. Ao submeter tais manuscritos, os autores devem apresentar uma justificativa com as razões para o texto ser longo.

3.2 Short communication. Esta seção é destinada principalmente para artigos que descrevem isolamento de substâncias conhecidas de nova fonte neotropical, ou resultados complementares de um trabalho em andamento. A comunicação deve ser escrita na seguinte ordem: Título, Resumo com 200 palavras, Palavras-chave, Introdução, Material e Métodos com detalhes dos dados experimentais sem sub-título, Resultados e Discussão em um corpo de texto sem título, Agradecimentos, no máximo

vinte Referências, e no máximo três Figuras e/ou Tabelas. Os autores deverão limitar o texto a no máximo 2000 palavras.

3.3 Revisões geralmente a partir de convites pelo editor-chefe. Os textos devem ser concisos e não é necessário incluir detalhes experimentais. O principal objetivo de revisões é fornecer, de uma forma concisa e precisa, o estado-da-arte de um assunto e informar o leitor os desenvolvimentos mais recentes nesta área.

3.4 Além dessas normas, modelos para formatação de trabalhos originais e da carta de submissão estão disponíveis em www.sbfgnosia.org.br/revista. Os autores são convidados a utilizar esses modelos ao preparar um manuscrito.

3.5 Os originais deverão ser redigidos em folhas de papel tamanho A4, espaço duplo, fonte tipo Times New Roman, tamanho 12, com texto justificado, margem de 2 cm em cada um dos quatro lados, e perfazendo o total de, no máximo, quinze e, no mínimo, cinco páginas, incluindo figuras, tabelas e quadros.

3.6 Título e subtítulo: Deverão estar de acordo com o conteúdo do trabalho, levando em conta o âmbito e objetivos da Revista. Estes deverão estar escritos em caixa baixa, negritados, fonte tipo Times New Roman, tamanho 14. Para os trabalhos redigidos nas línguas Portuguesa e Espanhola, providenciar também versão do título para a língua Inglesa, o qual acompanhará o Abstract. O nome das plantas no título deve estar completo, incluindo nome do autor e Família, conforme <http://www.tropicos.org>.

3.7 Autores: Os nomes dos autores devem vir abaixo do título, centralizados. O nome e os sobrenomes devem aparecer na ordem correta, sendo obrigatório que o primeiro (nome) e o último (sobrenome) apareçam por extenso (e.g. Carlos N. U. Silva ou Carlos N. Ubiratan Silva). No caso de vários autores, seus nomes deverão ser separados por vírgulas.

3.8 Filiação dos autores: Após o nome de cada autor deverá constar um número Arábico, sobrescrito, que indica sua instituição de procedência e, deverá aparecer logo abaixo da nominata dos autores, também centralizado e com endereços completos, inclusive o CEP da cidade. Deve-se assinalar o nome do autor correspondente com um asterisco sobrescrito, para o qual toda correspondência deverá ser enviada. O endereço eletrônico institucional, telefone e fax do autor principal aparecerão na primeira página do trabalho como uma nota de rodapé. A revista não publica endereços eletrônicos comerciais.

3.9 Abstract: Deverá apresentar concisamente o trabalho destacando as informações de maior importância, expondo metodologia, resultados e conclusões. Permitirá avaliar o interesse pelo artigo, prescindindo de sua leitura na íntegra. Dever-se-á dar destaque ao Resumo como tópico do trabalho (máximo de 200 palavras). Os manuscritos devem vir acompanhados também da versão do resumo para a língua Portuguesa. Para autores não-brasileiros, o resumo em português será feito pela revista.

3.10 Keywords: Também em número máximo de seis e separados por vírgula.

3.11 Introdução: Deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma área. Extensas revisões da literatura deverão ser substituídas por referências a publicações mais recentes, onde estas revisões tenham sido apresentadas e estejam disponíveis.

3.12 Material e Métodos: A descrição dos materiais e dos métodos usados deverá ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e a reprodução do trabalho. Processos e técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referenciados por citação.

3.13 Resultados: Deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e, sempre que possível, ser acompanhados de tabelas e figuras adequadas. Os dados, quando pertinentes deverão ser submetidos a uma análise

estatística.

3.14 Discussão: Deverá ser restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, evitando-se inferências não baseadas nos mesmos. Opcionalmente, Resultados e Discussão poderão ser apresentados em um único item.

3.15 Agradecimentos: Este item é opcional e deverá vir antes das Referências Bibliográficas.

4 REFERÊNCIAS

A formatação das referências deve ser padronizada em conformidade com as exigências da revista, como é mostrado abaixo:

4.1 Citações no texto: no início da citação: autor em caixa baixa, seguido do ano entre parênteses. Ex. Pereira (1999); no final da citação: autor em caixa baixa e ano - ambos entre parênteses. Ex. (Silva, 1999) ou (Silva & Souza, 1998) ou (Silva et al., 1999) ou (Silva et al., 1995a,b); citação textual: colocar, também, a página Ex. (Silva, 1999, p.24).

4.2 As Referências Bibliográficas serão ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, em caixa baixa e em ordem crescente de data de publicação. Levar em consideração as seguintes ocorrências:

4.2.1 Revista: Será utilizado a abreviatura do periódico, em itálico, definida no *Chemical Abstracts Service Source Index* (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizado e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo. Vargas TOH 1996. Fatores climáticos responsáveis pela morte de borboletas na região sul do Brasil. *Rev Bras Assoc Entomol* 11: (100-105).

No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de *Chemical Abstracts*, como segue:

Qu W, Li J, Wang M 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22: 203-206, apud *Chemical Abstracts* 116: 124855r.

Numa citação de citação, colocar o nome das fontes em itálico

Wax ET 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res* 41: 77-82, apud *Nat Prod Abs* 23: 588-593, 1978.).

4.2.2 Livro:

Costa AF 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

4.2.3 Capítulo de livro:

Farias CRM, Ourinho EP 1999. Restauração dentária. In: Goldaman GT (org.). *A nova odontologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 95-112.

4.2.4 Tese e Dissertação:

Lima N 1991. *Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem*. Campinas, 755p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas.

Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos naturais, Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Congressos:

Thomas G, Selak M, Henson PM 1996. Estudo da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* em neutrófilos humanos. *XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Florianópolis, Brasil.

4.2.6 Patentes:

Devem ser identificadas conforme modelo abaixo e na medida do possível o número do *Chemical Abstracts* deve ser informado.

Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,118,396*, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.

4.2.7 Páginas Internet:

Taylor L 2000. *Plant based drugs and medicines*. <http://www.rain-tree.com/plantdrugs.htm>, acesso em outubro 2009.

5 ABREVIATURAS

As unidades devem ser de acordo com o Sistema Internacional (SI) como adotado na 11th *General Conference on Weights and Measures*. Abreviaturas comuns para serem usadas são: m metro; ppm partes por milhão; cm centímetros; cpm contagem por minuto; mm milímetro; dpm desintegrações por minuto; µm micrometro; nm nanometro; kg kilograma; g grama; mg miligramas; µg microgramas; ng nanogramas; LD50 dose letal média; mL mililitro; LC50 concentração letal média; µL microlitro; Hz hertz; s segundos; M molar; min minutos; mM milimolar; h horas; M molar; µM micro molar; SD desvio padrão; SE erro padrão; Ci Curie; X média. Ao usar uma palavra que é, ou está confirmada para ser, uma marca de propriedade comercial, os autores devem utilizar o símbolo ®.

6. ILUSTRAÇÕES

6.1 A qualidade das ilustrações depende da qualidade dos originais fornecidos. As Figuras não podem ser modificadas ou realçadas pela equipe de educação da revista. Os gráficos devem ser apresentados como parte do arquivo do manuscrito. O contraste é importante.

6.2 Remover as cores das ilustrações, exceto para os gráficos em que o autor gostaria de tê-los publicados coloridos (ver a seção de Custos abaixo para informações).

6.3 Coloque as figuras em formato .TIFF, .jpg ou .eps, indicando o número e o título da figura. Tons não são aceitáveis. InscriçõesAs legendas devem estar com fonte Times New Roman, em um tamanho razoável que possa estar legível após redução, quando necessário.

7. CUSTOS

A Revista custeará integralmente os trabalhos de até quinze páginas, incluindo tabelas e figuras. Acima deste número de páginas, as despesas correrão por conta do(s) autor(es). Não serão aceitas fotografias coloridas, a não ser que o(s) autor(es) custeiem sua publicação, independente do número de páginas do trabalho.

8. PROVAS TIPOGRÁFICAS

As provas tipográficas serão enviadas ao autor correspondente em arquivo PDF. Modificações de frases ou adições não são permitidas nesta fase. É da responsabilidade do autor correspondente garantir que todos os autores do manuscrito estejam de acordo com as alterações feitas sobre as provas. As provas tipográficas devem retornar no prazo de cinco dias, a contar da data do recebimento das mesmas a fim de garantir a publicação do manuscrito no prazo.

Todo contato com a revista deve ser feito ao Editor, conforme endereço abaixo:

Revista Brasileira de Farmacognosia
Prof. Cid Aimbiré M. Santos - Editor
Laboratório de Farmacognosia
Departamento de Farmácia - UFPR
Rua Prof. Lothario Meissner, 632 - Jd Botânico
80210-170, Curitiba-PR, Brasil
revista@sbfgnosia.org.br